



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Biosorción de metales pesados por hongos
filamentosos, aislados de cuerpos de agua altoandinos
contaminados con relaves mineros de la sierra central
del Perú**

TESIS

**Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo
Parasitólogo**

AUTOR

Lee Kent ARRIETA AQUISE

ASESOR

Mg. Tito Libio SÁNCHEZ ROJAS

Lima, Perú

2019

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi familia que es mi gran apoyo, especialmente a mi madre Digna Beatriz Aquise Ramírez por ser una mujer empeñosa, trabajadora, luchadora que siempre tenía una palabra correcta para animarme, y seguir con mis proyectos adelante, mi infinita gratitud y amor para ella, por siempre.

A mis queridas hermanas Elvira, Wendy y Hillary, crecí con ellas y son parte de mi vida, las adoro.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Fondo para la Innovación, Ciencia y Tecnología (FINCyT), por haber financiado mi tesis que se realizó dentro del Proyecto: **“Monitoreo y evaluación de la calidad del agua en cabecera de cuenca del Río Rímac, lagos y lagunas de la Región Central del Perú para determinar organismos indicadores y marcadores moleculares de contaminación por metales pesados”**, Contrato N° 391-PNICP-PIAP-2014.

Agradezco al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado (VRIP) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su apoyo en el desarrollo de mi tesis como parte del **Programa de Promoción de Tesis de Pregrado** del año 2017.

A los profesores miembros del laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología, profesor Tito Libio Sánchez Rojas, Coordinador General del proyecto FINCyT Convenio 391-PNICP-PIAP-2014, del que fui partícipe, quien me orientó, aconsejó y brindó su apoyo y amistad durante el transcurso del desarrollo de mi tesis y al profesor Dr. Abad Flores Paucarima por su amistad, consejos y enseñanzas.

Al profesor Ph.D. Pedro Luis Castellanos Sánchez por su amistad, sus enseñanzas y permitirme iniciar mis prácticas de laboratorio y conocer más acerca del maravilloso mundo de los hongos filamentosos.

A mis amigos de laboratorio, perteneciente al proyecto FINCyT, por sus enseñanzas y amistad a: Diego Macedo, Miguel Tineo, y pertenecientes de proyectos VRIP: Diana Alonso, Isabel Condori, Hammerly Lino, Ingrid Ramírez y Keny Huayanay, por su apoyo y compartir sus conocimientos, y también a mis amigos con quienes compartí gratos momentos en el laboratorio: Alejandro, Jessi, Kenyo, Kevin, Ana Paula, Jean-Paul, Julio, Sergio, Wilma, Ronualdo, Francisco y amigos de otro laboratorio, Kevin Pizarro.

A mi amor, Magerlyn Huamantalla Huamán, por su gran apoyo, grandiosa persona a quien conocí durante el desarrollo de la presente tesis. Mi más profundo afecto y agradecimiento para ella.

A mis amigos de mi Promoción Microbiología Base 11, por su amistad y consejos: a Yohana, Karla, Noel, Carla, Carolina, Ana, Ricardo, Jaime, y a todos los demás por compartir 5 años pasando diferentes situaciones y momentos. Mi gratitud para todos.

Además los miembros del Jurado, Dra. Susana Gutiérrez Moreno, Ph.D. Pedro Castellano Sánchez y Mg. Jorge León Quispe, por su dedicación en la revisión y corrección de la presente tesis.

ABREVIATURAS

APD: Agar Papa Dextrosa.

ECA: Estándar de Calidad Ambiental.

ICP-MS: Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (Espectrometría de Masas con Fuente de Plasma Acoplado Inductivamente).

ITS: Internal Transcribed Spacer (Espaciadores Internos Transcritos).

LMP: Límite Máximo Permisible.

MMD: Medio Mínimo de Davis.

PPM: Partes Por Millón.

RPM: Revoluciones Por Minuto.

UTM: Universal Transversal Mercator (coordenadas Universales Transversales de Mercator)

V/V: Volumen sobre volumen.

VRIP: Vicerrectorado de Investigación y Postgrado.

YPG: Yeast Peptone Glucose.

IT: Índice de Tolerancia.

ÍNDICE GENERAL

	PAG.
1. INTRODUCCION.....	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Hongos filamentosos	4
2.2. Condiciones de crecimiento	5
2.3. Adaptación de los hongos a bajas temperaturas.....	6
2.4. Metales pesados	6
2.5. Drenajes ácidos de mina.....	8
2.6. Mecanismos implicados en procesos de remoción de metales.....	9
2.7. Captación de metales pesados en biomasa de hongos filamentosos.....	13
2.8. Línea de defensa de los hongos frente a la exposición de metales pesados y mecanismos en la captación de metales pesados	14
2.9. Fases de crecimiento de hongos en presencia de metales pesados	19
2.10. Isotermas de biosorción de metales pesados en hongos	20
2.11. Elución de metales biosorbidos	22
2.12. Identificación de los hongos.....	23
3. HIPÓTESIS	28
4. OBJETIVOS	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1. Localización de la zona de muestreo	30
5.2. Muestreo	30
5.3. Muestras.....	30
5.4. Determinación de los parámetros físico-químicos	30
5.5. Aislamiento de hongos filamentosos.....	31
5.6. Preparación de las soluciones Stock de los metales Cr (VI) y Cd (II)	31
5.7. Identificación morfológica de los hongos aislados	32
5.8. Tasa de crecimiento de los hongos filamentosos en medio sólido.....	32
5.9. Preparación del inóculo para las pruebas en medio líquido.	33
5.10. Prueba de tolerancia y/o resistencia de Cr VI y Cd II.	33
5.11. Crecimiento en placa a diferentes temperaturas.....	33
5.12. Crecimiento en placa a diferentes pH	34
5.13. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	34
5.14. Curva de crecimiento de los hongos filamentosos en medio líquido.....	34
5.15. Biosorción de Cr VI y Cd II por las cepas fúngicas en medio de cultivo	35

5.16. Biosorción de Cd II por biomasa fúngica en solución acuosa	36
5.17. Análisis de los metales pesados	37
5.18. Identificación Molecular de Hongos.....	37
5.19. Análisis de datos	40
6. RESULTADOS	40
6.1. Caracterización fisicoquímica de las muestras.....	40
6.2. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos	40
6.3. Identificación fenotípica y molecular de los hongos aislados.	41
6.4. Prueba de tolerancia/resistencia a Cr VI y Cd II	46
6.5. Crecimiento de las cepas seleccionadas a diferentes temperaturas.....	48
6.6. Crecimiento en placa de las cepas seleccionadas, a diferentes pH.	49
6.7. Concentración Mínima Inhibitoria en placa Petri (CMI).....	50
6.8. Curva de crecimiento de hongos filamentosos en medio de cultivo líquido ...	51
6.9. Biosorción de Cr VI y Cd II por cepa fúngica en medio de cultivo líquido	54
6.10. Biosorción de Cd II por biomasa fúngica en solución acuosa	60
7. DISCUSIÓN.....	61
7.1. Crecimiento de los hongos en diferentes pH y temperatura	61
7.2. Resistencia y tolerancia de los hongos filamentosos a metales pesados	62
7.3. Biosorción de metales por cepa fúngica en medio líquido	63
7.4. Biosorción de metales por biomasa fúngica en solución acuosa	64
7.5. Comportamiento de la biosorción de metales pesados	66
7.6. Caracterización e Identificación de los hongos filamentosos.....	68
8. CONCLUSIONES.....	69
9. RECOMENDACIONES.....	70
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	71
11. ANEXO.....	85

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Relación de cepas aisladas de los cuerpos de agua.	42
Tabla 2. Tasa de crecimiento de las cepas aisladas (mm d ⁻¹).	46
Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los hongos filamentosos.....	51
Tabla 4. Tasa de crecimiento μx (h ⁻¹) de las cepas en medio líquido	53
Tabla 5. Biosorción(Q) de Cd II por biomasa de <i>Trichoderma asperellum</i> (MRYP4) en solución acuosa.....	60
Tabla 6. Zonas de muestreo y caracterización fisicoquímica de las muestras.....	87
Tabla 7. Caracterización de los metales pesados de las muestras por ICP-Masas.	88
Tabla 8. Resistencia/tolerancia a Cr VI y Cd II en medio líquido.....	89
Tabla 9. Crecimiento de los hongos en placa (mm) a diferentes temperaturas	90
Tabla 10. Crecimiento de hongos en placa (mm) a diferentes pH.....	90
Tabla 11. Porcentaje de biosorción de Cr VI por las cepas <i>Trichoderma asperellum</i> (MRYP4) y <i>Trichoderma</i> sp (MRMP1) en caldo Czapek.	91
Tabla 12. Porcentaje de biosorción de Cd II por las cepas <i>Trichoderma asperellum</i> (MRYP4) y <i>Trichoderma</i> sp (MRMP1) en caldo Czapek.	91

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación Índice de Tolerancia (IT) vs Tiempo	19
Figura 2 . Representación sintetizada de las regiones de ADN ribosomal	26
Figura 3. Cebadores utilizados para la amplificación de la región ITS	26
Figura 4. Amplicones de las secuencias PCR.....	43
Figura 5. Distribución de los géneros obtenidos en el aislamiento.	43
Figura 6. Tolerancia/resistencia de las cepas aisladas.....	48
Figura 7. Crecimiento en placa de la cepas a temperaturas: 6.7, 20, 25 y 30 °C.....	49
Figura 8. Crecimiento en placa de la cepas a pH: 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 y 6.0.....	50
Figura 9. Curva de crecimiento de la cepa <i>Trichoderma asperellum</i> (MRPY4)	52
Figura 10. Curva de crecimiento de la cepa <i>Trichoderma</i> sp (MRMP1).....	53
Figura 11. Linealización de la fase logarítmica de las cepas fúngicas	54
Figura 12. Curva de crecimiento de MRPY4 a 57 ppm de Cr VI.	55
Figura 13. Curva de crecimiento de MRPY4 a 22.8 ppm de Cr VI.....	55
Figura 14. Curva de crecimiento de MRPY4 a 12.5 ppm de Cr VI.....	55
Figura 15. Curva de crecimiento de MRPY4 a 36 ppm de Cd II.....	56
Figura 16. Curva de crecimiento de MRPY4 a 23.3 ppm de Cd II.....	56
Figura 17. Curva de crecimiento de MRPY4 a 10.7 ppm de Cd II.....	56
Figura 18. Curva de crecimiento de MRMP1 a 30.6 ppm de Cr VI.	57
Figura 19. Curva de crecimiento de MRMP1 a 21 ppm de Cd II.....	57
Figura 20. % biosorción de MRYP4 a 57, 22.8 y 12.5 ppm de Cr VI.....	58
Figura 21. % biosorción de MRYP4 a 36, 23.3 y 10.7 ppm de Cd II.....	58
Figura 22. % biosorción de MRMP1 a 30.6 ppm de Cr VI.....	59
Figura 23. % biosorción de MRMP1 a 21 ppm de Cd II.....	59
Figura 24. Gráfica de contorno de Biosorción (Q) vs. Cd II ; Tiempo.	60
Figura 25. Mapa con puntos de muestreo.....	86
Figura 26. Morfología en placa. Cepa <i>Trichoderma asperellum</i> (MRYP4) con 5 días. 92	
Figura 27. Morfología en placa. Cepa <i>Trichoderma asperellum</i> (MRYP4) con 8 días. 92	
Figura 28. Morfología en placa. Cepa <i>Trichoderma</i> sp (MRMP1) con 5 días	92
Figura 29. Morfología en placa. Cepa <i>Trichoderma</i> sp (MRMP1) con 8 días	93
Figura 30. Morfología en placa. Cepa <i>Aspergillus</i> sp (MRYP9) con 8 días.....	93
Figura 31. Morfología en placa. Cepa <i>Aspergillus</i> sp (MRYP9) con 14 días.....	93
Figura 32. Morfología en placa. Cepa <i>Galactomyces candidum</i> (MSJJ2) con 8 días..	94
Figura 33. Morfología en placa. Cepa <i>Geotrichum</i> sp (MRYP3) con 8 días.....	94

Figura 34. Morfología en placa. Cepa MRYP7, no identificada, con 8 días.....	94
Figura 35. Morfología en placa. Cepa <i>Penicillium</i> sp 11 (MRYP8) con 14 y 52 días...	95
Figura 36. Morfología en placa. Cepas MRYP6 y MRHP1 con 14 días	95
Figura 37. Morfología en placa. Cepas MCJ2 y MSCJ2 con 14 días	95
Figura 38. Morfología en placa. Cepas MRMP2 y MRYP1 con 14 días.....	96
Figura 39. Morfología en placa. Cepas MCJ1 y MRYP2 con 7 días.....	96
Figura 40. Morfología en placa. Cepas MSCJ1 con 7 d y MSJJ1 con 14 días	96
Figura 41. Microcultivos de las cepas representativas.....	97
Figura 42. Cepa MRYP4 con 3 días pH: 2.0, 3.0, 4.0, 5.0.	98
Figura 43. Cepa MSCJ3 con 3 días pH: pH 2.0, pH3.0, pH 4.0, 5.0, pH 6.0.....	98
Figura 44. Índice de Tolerancia (IT)	99
Figura 45. Morfología de la cepa MRYP4 en presencia de Cd II y Cr VI	100
Figura 46. Morfología de las cepas MRMP1 y MSCJ3 en presencia de Cd II.....	100
Figura 47. Tolerancia a Cr VI de la cepa MRYP4 con 5 días de incubación.....	101
Figura 48. Tolerancia a Cr VI de la cepa MRYP4 con 14 días de incubación.....	101
Figura 49. Tolerancia a Cd II de la cepa MRYP4 con 5 días de incubación.....	102
Figura 50. Tolerancia a Cd II de la cepa MRYP4 con 14 días de incubación	102
Figura 51. Tolerancia a Cr VI de la cepa MRMP1 con 14 días de incubación	103
Figura 52. Tolerancia a Cd II de la cepa MRMP1 con 14 días de incubación.....	103
Figura 53. Tolerancia a Cr VI de la cepa MSCJ3 con 14 días de incubación	104
Figura 54. Tolerancia a Cd II de la cepa MSCJ3 con 14 días de incubación.....	104

RESUMEN

Los microorganismos ofrecen una alternativa potencial y rentable en la biotecnología ambiental, como los hongos capaces de crecer en relaves mineros en condiciones extremas, altas concentraciones de metales pesados, temperaturas bajas y pH ácidos. La presente tesis tiene como objetivo evaluar la resistencia y la biosorción de Cd II y Cr VI por los hongos filamentosos aislados de los cuerpos de agua de las Regiones Altoandinas de la sierra central de Perú (Lima, Junín y Pasco). Las muestras de agua analizadas procedieron del río San Juan, relaveras Yanamate, Carhuacayan, Huarón, Milpo, y laguna Santa Catalina, usadas en la actualidad como depósitos de relaves mineros. Los hongos fueron aislados en agar YPG, y seleccionados según su capacidad de resistencia a Cr VI y Cd II, posteriormente fueron identificados fenotípicamente y molecularmente mediante los marcadores ITS 1 e ITS 4. Así mismo se estudiaron el crecimiento de las cepas a diferentes pH y temperaturas, también se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para estos metales, finalmente se realizaron las pruebas de biosorción de Cr VI y Cd II, con cepas de *Trichoderma asperellum* (MRYP4) y *Trichoderma* sp (MRMP1). Se identificaron 20 hongos filamentosos de lagunas contaminadas con relaves mineros, las cepas *Trichoderma asperellum* (MRYP4), *Trichoderma* sp (MRMP1) y *Trichoderma koningiopsis* (MSCJ3) presentaron una mayor tolerancia a Cr^{+2} y Cd^{+2} , entre 200 y 800 ppm. Se obtuvo el 73 % de biosorción de Cd II con la cepa *Trichoderma asperellum* (MRYP4) y un 47 % de biosorción de Cr VI con la cepa *Trichoderma* sp (MRMP1), además una biosorción de Cd II de 1.18 mg del metal/g de biomasa en solución acuosa, realizado por la cepa *Trichoderma asperellum* (MRYP4).

PALABRAS CLAVE: Biosorción, tolerancia, resistencia, hongos filamentosos, identificación molecular.

ABSTRAC

Microorganisms offer a potential and cost-effective alternative in environmental biotechnology, such as fungi capable of growing in mining tailings in extreme conditions, high concentrations of heavy metals, low temperatures and acid pH. The objective of this thesis is to evaluate the resistance and biosorption of Cd II and Cr VI by the filamentous fungi isolated from the bodies of water of the High Andean Regions of the central highlands of Peru (Lima, Junín and Pasco). The water samples analyzed came from the San Juan River, Yanamate, Carhuacayan, Huarón, Milpo, and Santa Catalina lagoons, currently used as mine tailings deposits. The fungi were isolated on YPG agar, and selected according to their capacity of resistance to Cr VI and Cd II, later they were phenotypically and molecularly identified by the ITS 1 and ITS 4 markers. Likewise, the growth of the strains at different pH and temperatures was studied. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for these metals was also determined, finally the biosorption tests of Cr VI and Cd II were performed, with strains of *Trichoderma asperellum* (MRYP4) and *Trichoderma* sp (MRMP1). We identified 20 filamentous fungi from lagoons contaminated with mine tailings, the strains *Trichoderma asperellum* (MRYP4), *Trichoderma* sp (MRMP1) and *Trichoderma koningiopsis* (MSCJ3) presented a higher tolerance to Cr + 2 and Cd + 2, between 200 and 800 ppm. 73% of biosorption of Cd II was obtained with the strain *Trichoderma asperellum* (MRYP4) and 47% of biosorption of Cr VI with the strain *Trichoderma* sp (MRMP1), in addition a biosorption of Cd II of 1.18 mg of the metal / g of biomass in aqueous solution, made by the strain *Trichoderma asperellum* (MRYP4).

KEY WORDS: Biosorption, tolerance, resistance, filamentous fungi, molecular identification.

1. INTRODUCCION

Algunos metales pesados, son esenciales para el metabolismo y crecimiento de los organismos en general, como el Na, K, Mg, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn y Mo, pero se ha demostrado que concentraciones elevadas tienen efectos tóxicos sobre las células, principalmente por su capacidad para alterar o desnaturalizar las proteínas (Cañarizares-Villanueva, 2000). Debido a ello, a la biodisponibilidad y a la biodinámica que tiene en los ecosistemas naturales, se les ha dado prioridad como los contaminantes inorgánicos más importantes en el ambiente. Aun cuando se encuentren presentes en cantidades bajas e indetectables, su característica recalcitrante permite la persistencia de los metales pesados en cuerpos de agua, y que a través de procesos naturales como la biomagnificación, su concentración se puede elevar de tal manera que llegue a ser tóxica (Atkinson, 1998).

Los metales se pueden clasificar según su interés e impacto ambiental, en cuatro categorías: I) metales pesados tóxicos, II) metales estratégicos, III) metales preciosos y IV) radionúclidos. Aquellos metales que se encuentran en las categorías I y IV son los de mayor importancia para eliminarse del ambiente (Volesky, 1990). El grupo conformado por mercurio, plomo y cadmio se encuentra en primer lugar debido al impacto ambiental que ocasionan, sin embargo, por la introducción de nuevas tecnologías y combustibles verdes, la contaminación por mercurio y plomo ha disminuido. En cambio, el cadmio se libera al ambiente, por ejemplo, como subproducto en la obtención de zinc, y además se emplea con mayor asiduidad en la fabricación de baterías y cables, colorantes de cadmio, células fotoeléctricas, PVC, fertilizantes agrícolas, entre otros, considerado un factor contaminante importante y ubicuo (Sala *et al.*, 2010).

El impacto ambiental de la contaminación del suelo, agua y sedimentos con metales pesados depende fundamentalmente de la capacidad que tienen los metales para

acomplejarse con componentes ambientales y como afecta esto al ecosistema. Los metales no se degradan en el ambiente, así que una vez liberados se desplazan entre el aire, agua y suelo, mediante cambios en su estado de oxidación o incorporándose a la materia orgánica (que provienen de restos orgánicos, ya sean de plantas y animales, y sus productos de desecho), y seres vivos (tejido vegetal y animal) (Vullo, 2003).

La precipitación, oxidación, reducción, intercambio iónico, filtración, tratamiento electroquímico, las tecnologías de membrana y la recuperación de evaporación son algunos de los métodos convencionales utilizados para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con metales pesados, pero dichos procesos resultan costosos e ineficientes, más aún cuando la concentración de los metales es muy baja (Volesky, 1990). El empleo de sistemas biológicos para el tratamiento y eliminación de metales pesados a partir de soluciones diluidas tiene el potencial para hacerlo de una manera más eficiente y menos costosa (Hutchins, 1986).

Los procesos en los cuales los microorganismos interactúan con los metales pesados son variados, por ejemplo, cuando ellos y sus productos pueden ser bioacumuladores muy eficientes de metales pesados solubles y particulados (Cañizares-Villanueva, 2000). En la práctica existen tres categorías de procesos biotecnológicos para el tratamiento de aguas residuales que contienen metales pesados, ellos son: la biosorción, la precipitación extracelular y la captación a través biopolímeros purificados y otras moléculas especializadas, derivadas de células microbianas (Gadd & White, 1993).

Los procesos de bioadsorción son en esencia pseudoprosos de intercambio iónico, en los cuales, los iones metálicos son atraídos hacia la superficie de materiales biológicos muertos o inactivados, o hacia componentes de carga opuesta que se encuentran unidos a ellos. Este tipo de interacción depende del pH del líquido y de las características del metal. La pared celular es considerada como responsable de este

fenómeno en ciertas algas, hongos y bacterias (Vijayarghavan y Yun, 2008; Eccles, 1999).

Los metales pesados son considerados sumamente tóxicos a altas concentraciones para las células. Es por ello que, si se considera el uso de células vivas para un sistema de eliminación de metales, la toxicidad puede conducir a la muerte e inactivación celular (Shumate II, 1985). Sin embargo, el uso de biomasa muerta o productos derivados de esta, elimina inconvenientes como la toxicidad celular ocasionada por los metales pesados, los efectos por condiciones adversas de misma operación y un menor coste en suplemento de nutrientes. En contraste con ello, las células vivas pueden presentar una variedad más amplia de mecanismos para la captación y eliminación de los metales pesados, tales como el transporte, la formación de complejos extracelulares, bioacumulación y la precipitación (Cañizares-Villanueva, 2000).

Los hongos filamentosos son organismos que se pueden adaptar a condiciones severas a comparación de otros microorganismos, en parte gracias a la pared celular la cual está formada por glucanos, glicoproteínas y quitina el cual es un compuesto polisacárido fuertemente rígido (Pontón, 2008; Moreno, 2000), por lo cual puede resistir condiciones de estrés como los ambientes acuáticos con niveles de acidez muy bajas, elevada concentración de metales pesados y condiciones frías, como en las que se encuentran las lagunas Altoandinas de la Región Pasco y Junín del Perú.

A nivel industrial la biosorción podrían llevarse a través de varios modos, entre los más importantes se encuentran el modo continuo, la cual puede ser incorporada con una columna de lecho fijo o por lotes. Para la aplicación comercial de este sistema primero se debería implementar un sistema de la biosorción en las plantas de tratamiento de aguas residuales industriales y domésticas (Vijayaraghavan & Balasubramanian, 2015).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. HONGOS FILAMENTOSOS

Los hongos filamentosos son microorganismos eucariotas, aerobios, y se reproducen de manera natural mediante esporas, de manera sexual o asexual (Vargas y Villamizar, 2005). La pared celular en los hongos es multilaminada y las laminillas que la conforman están formadas en fibrillas diversamente orientadas. Los principales constituyentes químicos de la pared celular de los hongos son diversos polisacáridos, pero se encuentran entre ellos proteínas, lípidos y otras sustancias, es decir no es la misma en todos los hongos. La quitina, que es un compuesto polisacárido fuertemente rígido, está presente de forma característica en la pared celular de la mayoría de hongos. Los hongos filamentosos se alimentan por absorción de los nutrientes simples y solubles mediante las hifas, la digestión del alimento se da gracias a la secreción de enzimas sobre el sustrato alimenticio. (Alexopoulos & Mims, 1985).

Las esporas fúngicas son cuerpos de resistencia que forman los hongos en estado latente o de reposo, o en estructuras de reproducción especializadas, las cuales pueden germinar y dar origen a un nuevo individuo. Los hongos filamentosos se reproducen de dos maneras diferentes: sexual y asexualmente, La reproducción sexual se da por la unión de dos núcleos haploides compatibles (donde las esporas pueden ser móviles) para dar lugar a un núcleo diploide. Por otro lado, la reproducción asexual, no se realiza con la unión de dos núcleos de células sexuales ni de órganos sexuales, en este caso se reproducen por simple diferenciación (esporas) o división de las hifas de crecimiento en varios fragmentos, y que tienen la capacidad de dar origen a un nuevo individuo de la misma especie (Alexopoulos & Mims, 1985).

Fisiológicamente, los hongos filamentosos se adaptan a condiciones más severas que otros microorganismos, su desarrollo en sustratos puede ser con concentraciones de azúcar elevados, hasta 10 %, debido a que estos microorganismos no son sensibles a

la presión osmótica elevada, creciendo muy lentamente de 5 a 7 días, y resistiendo a condiciones muy ácidas con pH cercano a 1, así como pH altos cercanos a 9, en general presentan un pH óptimo entre 5-6 (Moreno, 2000). Los hongos filamentosos utilizan la glucosa como fuente de carbono, pero también pueden aprovecharse de compuestos de carbono orgánico complejos como el almidón y la celulosa. De igual forma, aprovechan fuentes de nitrógeno inorgánico como sales de amonio y nitratos y emplean además sustratos con nitrógeno inorgánico y carbono, como por ejemplo el extracto de levadura y peptona (Pelczar y Reid, 1996).

En columnas de agua de los ambientes acuáticos continentales es posible encontrar propágulos de hongos (células de levaduras, fragmentos de hifas, y varios tipos de esporas). Los hongos que se presentan principalmente en ambientes acuáticos son los Chytridiomycetes y en segundo lugar los Hyphomycetes acuáticos y levaduras, además se pueden encontrar formas fúngicas que son principalmente terrestres (diversos hongos imperfectos, endófitos), lo que sugiere que su distribución no se limita a un solo tipo de hábitat. Debido a la mayor disposición de materia orgánica, los hongos filamentosos se distribuyen principalmente en la zona litoral y el sedimento del fondo, mientras que los hongos unicelulares como los Chytridiomycetes y las levaduras se encuentran principalmente en la zona pelágica (Voronin 2010; Wurzbacher *et al.* 2010).

2.2. CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Según Alexopoulos (1996), la temperatura influye en el crecimiento, la germinación de esporas, reproducción y en general, todas las actividades del organismo. Los hongos se pueden clasificar como psicrófilos, mesófilos o termófilos. Los psicrófilos tienen un mínimo de temperatura de crecimiento menor a 0 °C y máxima menor a los 20 °C siendo óptima en un rango de 0 °C – 17 °C. Los mesófilos, donde se encuentran la mayoría de los hongos, tienen una temperatura mínima de 0 °C, máxima menor a 50 °C y óptima entre 15 y 40 °C, y los termófilos una mínima a los 20 °C máxima mayor a los 50 °C y

óptima entre 35 y 50 °C. La mayoría de los hongos crece en un rango de temperatura entre 25 a 30 °C (Kavanagh, 2005).

El pH es fundamental para el desarrollo de los hongos, a un pH alto se ve afectada la solubilidad de los metales y a pH bajo se afectan los sistemas enzimáticos, el ingreso de vitaminas esenciales y ácidos orgánicos y la toma de minerales (Cochrane, 1963). El pH óptimo se encuentra entre 4 y 6 (Kavanagh, 2005)

2.3. ADAPTACIÓN DE LOS HONGOS A BAJAS TEMPERATURAS

En general se pueden resumir los mecanismos de adaptación de los microorganismos en tres: función de enzimas, transporte de nutrientes y función de membrana celular (Gocheva *et al.*, 2006). Estos microorganismos no tienen una regulación de temperatura, su temperatura interna es cercana al ambiente que lo rodea, sin embargo, han desarrollado varias formas de adaptación como cambios estructurales a nivel de membrana, proteínas constitutivas y enzimas adaptadas con actividad a temperatura inferior a los 20 °C (Gerday *et al.*, 2000).

Las tasas metabólicas menores, llevando a una disminución en la demanda de ATP y acumulación de electrones en ciertos puntos de la cadena respiratoria. Esto conlleva a un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno como radicales superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo; estas especies reactivas causan estrés oxidativo en procariontes y eucariontes, puesto que dañan componentes celulares como DNA, lípidos y proteínas, para prevenir el daño las células aeróbicas tienen enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y catalasa; es así como estos organismos presentan niveles más altos de estas enzimas antioxidantes.

2.4. METALES PESADOS

A pesar de ser controvertida, la denominación metal pesado, es empleada ampliamente en el ámbito científico. Los elementos comprendidos bajo esta denominación presentan

como característica en común, una elevada densidad. Según la definición realizada por Aguirre (2011), metal pesado se denomina a aquel elemento que tiene una densidad igual o superior a 5 g cm^{-3} cuando está en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20, excluyendo a los metales alcalinos y alcalino-térreos, que en concentraciones bajas pueden dañar los seres vivos y tienden a acumularse en la cadena alimenticia. Además, su presencia en la corteza terrestre es inferior al 0,1% y casi siempre menor del 0,01%. Junto a estos metales pesados existen otros elementos químicos que, aunque son metales ligeros o no metales, se suelen englobar con ellos por presentar orígenes y comportamientos asociados; es éste el caso del arsénico, boro, bario y selenio (Aguirre *et al.*, 2011; Cheng, 2012).

Mediante una comparación entre los típicos metales esenciales para la vida y los que son potencialmente peligrosos, se podría agrupar a los metales de la siguiente manera (Patterson, 1987):

Oligoelementos o micronutrientes: también conocidos como elementos esenciales, son aquellos requeridos en pequeñas cantidades, o cantidades traza, por plantas y animales, y son necesarios para que los organismos completen su ciclo vital. Por encima de cierto umbral de concentración se vuelven tóxicos. Dentro de este grupo se encuentran: Na, K, Mg, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo.

Metales peligrosos: son aquellos cuya presencia en determinadas cantidades en seres vivos llevan a disfunciones en el funcionamiento de sus organismos. Resultan altamente tóxicos y presentan la propiedad de acumularse en los organismos vivos. Ellos son, principalmente: Cr, Cu, Zn, As, Se, Ag, Cd, In, Sn, Hg, Ti, Pb y Bi.

De acuerdo a lo descrito anteriormente, los llamados “metales pesados” (todos aquellos con densidad mayor a 5 g cm^{-3}) se encuentran dentro de los denominados metales peligrosos. Por otro lado, el grupo de los elementos esenciales, se dividen en “metales ligeros” (Na, K, Mg, Ca) y “metales pesados” (Cr y los metales con alto peso atómico en

la tabla periódica), en este caso dichos metales pesados, a pesar de estar dentro del grupo de metales esenciales, resultarán tóxicos al sobrepasar cierta concentración (Patterson, 1987; Das & Dash, 2017).

2.5. DRENAJES ÁCIDOS DE MINA

2.5.1. Problemática de los drenajes ácidos de mina

Se describe a las aguas ácidas de mina, a los drenajes que comprenden valores de pH entre 2 y 4, y que presentan altas concentraciones de metales disueltos. Dichas condiciones ocasionan la mortandad de peces y crustáceos de ríos, afecciones al ganado, y destrucción de cultivos y riberas; características siempre asociadas a una coloración ocre-amarillenta de los lechos de ríos y lagos afectados, así como un incremento de la turbiedad de las aguas. La contaminación que producen los drenajes ácidos de mina han sido profusamente descritas por numerosos investigadores (Pamo *et al.*, 2002).

2.5.2. Generación de aguas ácidas

El principal responsable de la formación de aguas ácidas se debe al proceso de oxidación de la pirita, esta oxidación se da de manera natural, pero dicha reacción se magnifica cuando las rocas que contienen materiales sulfatados, son excavadas a tajo abierto o en vetas en minas subterráneas, donde reaccionan con el aire o el agua para crear ácido sulfúrico (Pamo *et al.*, 2002; Nordstrom & Alpers, 1999).

2.5.3. Caracterización de las aguas ácidas de mina

Es de suma importancia realizar una caracterización precisa del drenaje ácido para realizar la correcta selección y empleo de los dispositivos operacionales que configuran el conjunto del tratamiento pasivo.

Una adecuada caracterización de un drenaje ácido de mina, debe incluir la medida precisa y representativa del caudal, de los parámetros físico-químicos como: pH in situ,

pH en laboratorio, alcalinidad total, acidez o alcalinidad neta (expresadas todas como CaCO_3); y del análisis de las concentraciones de Fe^{2+} , Fe total, Al, Mn, SO_4 y conductividad eléctrica. También sería adecuado analizar las concentraciones de Ca, Mg, Na, Cl, K, Br y Zn, lo que permite en la mayoría de los casos efectuar un correcto balance iónico. El conjunto de estas medidas se ha de registrar al menos durante un año hidrológico. La acidez y la alcalinidad de un drenaje de mina son parámetros básicos en la selección del tipo de tratamiento pasivo; representan la capacidad de esas aguas para neutralizar una base o un ácido (Pamo *et al.*, 2002).

2.6. MECANISMOS IMPLICADOS EN PROCESOS DE REMOCIÓN DE METALES

Estos fenómenos se pueden definir como: bioacumulación, biomineralización, biotransformación y biosorción los cuales están mediados por los microorganismos.

2.6.1. Bioacumulación

Este mecanismo celular involucra un sistema de transporte de membrana que internaliza al metal pesado presente en el entorno celular con gasto de energía. Este consumo energético se genera a través del sistema $\text{H}^+ \text{ ATPasa}$. Una vez incorporado el metal pesado al citoplasma, éste es secuestrado por la presencia de proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioneínas o también puede ser compartimentalizado dentro de una vacuola, como ocurre en hongos.

2.6.2. Biomineralización

Los microorganismos son capaces de precipitar metales y radionúclidos como carbonatos e hidróxidos, mediante un mecanismo de resistencia codificado en plásmidos. Este mecanismo aparece por el funcionamiento de una bomba que expulsa el metal tóxico presente en el citoplasma hacia el exterior celular en contracorriente a un flujo de H^+ hacia el interior celular. Esto produce una alcalinización localizada sobre la superficie celular externa y por lo tanto la precipitación del metal pesado.

Otra forma de precipitar los metales es a través de la formación de sulfuros o fosfatos, como resultado de alguna actividad enzimática celular. Un ejemplo de ello es la precipitación de sulfuros metálicos en reactores con cultivos mixtos de bacterias reductoras de sulfato o la acumulación de CdS en la pared celular de las bacterias *Klebsiella planticola*, *Pseudomonas aeruginosa* y la biomineralización de cobre por parte de *Penicillium ochrochloron* y *Candida fukuyamaensis* (Crusberg, 2004; Irazusta *et al*, 2016).

2.6.3. Biotransformación

Este es un proceso que involucra un cambio químico sobre el metal pesado, como por ejemplo en el estado de oxidación o metilación. Esta transformación biológica de los metales pesados que resultan tóxicos mediada por enzimas microbianas puede dar como resultado compuestos poco solubles en agua o bien compuestos volátiles. El ejemplo más claro es el ciclo del Hg en la naturaleza, donde la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* puede reducir el catión Hg^{2+} a Hg^0 , y otros organismos pueden luego metilarlo dando como producto el CH_3Hg^+ y $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$, que son volátiles y aún más tóxicos que el propio Hg (Beltrán-Pineda & Gómez-Rodríguez, 2016).

Las reducciones de V (V) a V (III), Au (III) a Au (0) y Cr (VI) a Cr (III), conducen a la precipitación del metal bajo condiciones fisiológicas. Entre estos últimos el Cr es el metal más ampliamente utilizado en la industria de aceros, automóviles, equipamiento de hospitales y curtiembres, entre otras. El Cr (VI) es un contaminante de prioridad 1 catalogado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA: www.epa.gov), ya que es estable en solución acuosa y por lo tanto de alta movilidad en diferentes ambientes, con un alto potencial mutagénico y carcinogénico. El pasaje a Cr (III) produce la inmovilización por precipitación de hidróxidos y la disminución en la mutagenicidad. La utilización de microorganismos resistentes a Cr con capacidad de

bioconversión Cr (VI) en Cr (III) es de fundamental importancia en el tratamiento biológico de efluentes industriales.

Entre los microorganismos que pueden biotransformar el Cr VI a Cr III, se encuentran: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus clavatus* y *Rhizopus oryzae* que son capaces de biotransformar el Cr VI a Cr III en efluentes de tenería y en soluciones acuosas conteniendo Cr VI (Sukumar, 2010; Das, 2014; Sakthivel *et al.* 2016).

2.6.4. Biosorción

La biosorción se denomina al fenómeno donde participan células microbianas vivas, muertas, y microorganismos químicamente pretratados. La captación del metal por biomasa celular viva o muerta consiste de dos diferentes modos: el primer modo es independiente de la actividad metabólica e involucra uniones de los iones metálicos a la superficie de la pared celular y al material extracelular, dicho mecanismo es referido como bioadsorción o una captación pasiva, la cual ocurre tanto en células vivas y muertas. El segundo modo consiste en la captación de metales dentro de la célula a través de la membrana celular y es dependiente del metabolismo, es referida como una captación intracelular (bioabsorción), captación activa o bioacumulación, la cual sólo ocurre en células vivas (Viraraghavan y Srinivasan, 2011). Las investigaciones han indicado que a altas concentraciones de metales el modo de captación activa no puede contribuir significativamente a la absorción de metales, especialmente para hongos filamentosos. El mecanismo de captación intracelular es complejo y aun no es completamente entendido según indican los autores.

Los fenómenos propios de biosorción se caracterizan por la retención del metal, que pueden ocurrir mediante interacciones fisicoquímicas tales como el intercambio iónico, complejación, adsorción física e hidrólisis. Dichas interacciones de los iones metálicos se producen con grupos funcionales presentes en la superficie celular, tales como los grupos carboxilo, amino, amida, hidroxilo, fosfato y sulfhidrido (Viraraghavan y

Srinivasan, 2011), incluso es posible que la quitina y el quitosano participen en la captura de iones metálicos. Hefnawy y Razak (1998) y Zhou *et al.* (2013) reportaron el aumento de proteínas, azúcares totales y quitina en la pared celular de la cepa de *Rhizopus arrhizus*. La bioadsorción es un mecanismo de cinética rápida que no presenta una alta dependencia con la temperatura y en muchos casos puede estudiarse en detalle mediante la construcción de los modelos de isothermas de Langmuir y Freundlich.

Es posible la biosorción de oxi-aniones (molibdato, vandato, cromato, dicromato) por la atracción electrostática hacia grupos funcionales cargados positivamente. En la biosorción de Cr^{6+} a pH muy bajo las especies iónicas de $[\text{HCrO}_4]^-$, $[\text{Cr}_2\text{O}_7]^{2-}$, $[\text{Cr}_4\text{O}_{13}]^{2-}$ y $[\text{Cr}_3\text{O}_{10}]^{2-}$ cargadas negativamente son predominantes y estas son atraídas hacia los sitios activos cargados positivamente en la superficie celular, como los iones hidronio (H_3O^+) (Bankar *et al.*, 2009). Se descubrió que los aniones derivados del Cr (VI) se bioadsorben en *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus nigricans* a pH muy bajo en soluciones, ya que los aniones se pueden unir a los sitios activos protonados del biosorbente que es de naturaleza principalmente electrostática (Wang y Chen, 2006).

Investigaciones han indicado que los iones metálicos pueden ser intercambiados con iones de calcio, hidrógeno, magnesio y potasio durante los procesos de bioabsorción, siendo liberados de la célula fúngica, se entiende este mecanismo como un proceso de intercambio iónico (Viraraghavan y Srinivasan, 2011).

La capacidad biosorbente de las células fúngicas muertas se ha estudiado extensamente en comparación con las células vivas. Y se ha llegado a la conclusión que la capacidad biosorbente de las células muertas puede ser mayor, equivalente o inferior al de las células vivas. Pero el uso de biomasa muerta en aplicaciones industriales ofrece ciertas ventajas sobre las células vivas. Es probable que los sistemas que utilizan células vivas sean más sensibles a la concentración de iones metálicos (limitaciones por toxicidad) y a las condiciones operativas adversas (pH y temperatura)

y un requerimiento de suministro constante de nutrientes (mayor costo de operación para las corrientes de desechos desprovistas de nutrientes), además la recuperación de metales y la regeneración de biosorbentes es más complicada para las células vivas. La biomasa muerta puede obtenerse de fuentes industriales como un producto de desecho de procesos de fermentación establecidos (Viraraghavan y Srinivasan, 2011).

Se ha observado que la biosorción de iones metálicos depende del pH. La eliminación óptima generalmente se logra en el rango de pH de 4-5, y la biosorción se reduce sustancialmente a un pH de 2.5. Con un pH de 4,5 el grupo molecular activo más importante es el fosfato, el carboxilo y el sulfato, y la atracción electrostática al grupo funcional con carga negativa puede ser el mecanismo de biosorción. Se ha encontrado que la biosorción de metales en ciertas cepas fúngicas resultan ser selectivas y en algunos casos competitivas para los metales (Wang y Chen, 2006).

2.7. CAPTACIÓN DE METALES PESADOS EN BIOMASA VIVA DE HONGOS FILAMENTOSOS

La captación de metales por biomasa viva, se da en función a la edad celular, composición del medio de crecimiento, tiempo de contacto, pH de la solución metálica y la temperatura. Viraraghavan y Srinivasan (2011), indican que la bioadsorción de metales por la biomasa, suele ser de naturaleza bifásica, la cual consiste de una fase inicial rápida contribuyendo hasta un 90 % de la biosorción con una duración cercana a los 10 minutos y una segunda fase que es más lenta, con una duración de entre 4 a 6 horas. El medio de crecimiento afecta también, se ha observado un incremento de la biosorción durante la fase lag o estadios tempranos de crecimiento y disminuye a medida que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria. De acuerdo a las investigaciones y resultados obtenidos por muchos investigadores, la mayor captación de iones metálicos se da a nivel de la superficie celular. La biosorción de iones metálicos

es fuertemente dependiente del pH. La carga superficial de las células fúngicas es predominantemente negativa, salvo algunas excepciones.

2.8. LÍNEA DE DEFENSA DE LOS HONGOS FRENTE A LA EXPOSICIÓN DE METALES PESADOS Y MECANISMOS EN LA CAPTACIÓN DE METALES PESADOS

Dentro de la amplia diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes y microorganismos tolerantes a metales. Los resistentes se caracterizan por poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, inducidos por la presencia del metal. En cambio, los tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia de metal. Tanto los microorganismos resistentes como tolerantes son de particular interés como captadores de metales en sitios contaminados, debido a que ambos pueden extraer los contaminantes. Según Anahid *et al.* (2010) se podría resumir que existen dos mecanismos que han sido propuestos para la tolerancia a metales pesados en hongos: El secuestro extracelular (quelación y unión a la pared celular) y el secuestro físico intracelular de los metales mediante la unión a proteínas u otros ligandos para evitar que dañe los blancos celulares sensibles al metal.

Según Pócsi (2011) en su publicación denominada “*Toxic Metal/Metalloid Tolerance in Fungi- A Biotechnology-Oriented Approach*”, los microorganismos como los hongos al entrar en contacto con los metales pesados poseen una serie de líneas de defensa de tal manera que reducen el efecto tóxico y mortal del metal hacia la viabilidad celular, los cuales lo describió como se muestra a continuación:

2.8.1. Primera línea de defensa: quelación extracelular y así como a los constituyentes de la pared celular

La quelación del metal por metabolitos de pequeña masa molecular, péptidos y proteínas es un crucial elemento importante de casi todo el proceso de detoxificación, por lo tanto, la significancia de la reacción de quelación extracelular y citosólica no puede

ser sobreestimada. La secreción de la Glutathione (GSH) es un elemento muy importante de la homeostasis-GSH en las levaduras bajo diferentes condiciones medioambientales.

La secreción de oxalato es bien documentada con hongos de la podredumbre marrón y podredumbre blanca, y este proceso, es estimulado bajo el estrés de Cu (II) y Cd (II). La formación a granel de los cristales de oxalato metálico insoluble al agua es indudablemente un camino eficiente para prevenir la entrada de iones metales tóxicos a las células fúngicas. En adición el oxalato es primeramente importante para mantener el sistema ligninolítico de los basidiomicetos de la pudrición blanca. Un amplio rango de hongos ha sido reportado por producir un material extracelular mucilaginoso (MECM o emulsionante) con excelente capacidad de unión a metales tóxicos. Como lo demostraron en exposición al Ni (II). A diferencia Cu (II), Pb (II) y Zn (III), no desencadenó la producción de MECM por *Curvularia lunata* (Pócsi, 2011).

Pócsi (2011) indica que la saturación de los ácidos grasos celulares, que es claramente atribuible a los procesos de peroxidación lipídica, iniciada por Ni (II). Es importante destacar que la producción de pululano por *Aureobasidium pullulans* se vio afectada positivamente por exposiciones de Ni (II) y Cd (II) y el pululano aumentó la tolerancia de Cd (II), de esta especie industrialmente importante. También informaron una relación elevada de MECM en la biomasa en cultivos de *Trametes versicolor* y de *Gloeophyllum trabeum* expuestos a Cu (II).

Los hongos micorrízicos arbusculares tales como las especies *Glomus* sp y *Gigaspora* sp producen una glicoproteína del suelo llamada glomalina, que posee una notable capacidad para secuestrar Cu (II). La glomalina se encuentra principalmente en la pared celular. Además de la glomalina, otros polímeros de la pared celular como la quitina y la melanina también pueden participar en la biosorción de metales. Como lo demuestran las exposiciones a Zn (II) afectaron los patrones de expresión del gen de quitina sintasa y la deposición de quitina en un hongo *Micoriza ericoide*.

Aunque la disminución de la biodisponibilidad de los metales / metaloides tóxicos a través de la complejación extracelular, la precipitación y la unión a constituyentes de la pared celular representa una estrategia razonable y directa en el desarrollo de cepas, las herramientas genéticas para alcanzar este objetivo todavía están en una etapa prematura. La falta de sistemas de levadura que modelen adecuadamente las vías de desintoxicación de metales tóxicos / metaloides extracelulares obviamente representa una desventaja importante, especialmente cuando se compara con la abundancia de modelos e información disponible sobre la organización y regulación de las vías de desintoxicación intracelular.

2.8.2. Segunda línea de defensa: Transporte, quelación intracelular y compartimentalización.

Los metales pesados ingresan a las células a través de canales y transportadores, que normalmente facilitan la absorción de micronutrientes esenciales de metales de transición como Fe, Mn y Zn, aniones como fosfato y sulfato, así como azúcares (glucosa) y derivados del azúcar (glicerol). En teoría, una de las formas más simples y efectivas para evitar los metales / metaloides tóxicos fuera de la célula es eliminar el canal o el transportador responsable de la absorción de un ion tóxico de metal / metaloide. Desafortunadamente, estos iones pueden canalizarse a través de múltiples transportadores hacia el citoplasma, y agravando la situación, la ausencia de incluso en una de estas rutas de transporte puede alterar el metabolismo normal de las células. Se ha demostrado que la eliminación de los siguientes canales y transportadores de membrana plasmática confiere tolerancia a metales a células de *S. cerevisiae* expuestas a metales / metaloides, como ejemplos tenemos:

- As (V): Pho84p de alta afinidad y los transportadores de fosfato Pho87p de baja afinidad
- As (III) y Sb (III): Canal de aquaporina Fps1p.

- Transportadores Cd (II): Zrt1p Zn (II) y Smf1p y Smf2p para Mn (II).
- Cr (VI) y Se (VI): transportadores de sulfato Sul1p y Sul2p.

Es importante destacar que las células de levadura que carecen de Pho86p, que se requiere para el tráfico de Pho84p del Retículo endoplasmático a la membrana del citoplasma, o Gtr1p, una proteína citoplásmica de unión al GTP, un regulador del transporte de fosfato a través de Pho84p, muestran fenotipos tolerantes As (V). Además, la eliminación de BSD2 que codifica una proteína del retículo endoplasmático que transporta los transportadores Smf1p y Smf2p a las vacuolas para la degradación dio como resultado hipersensibilidades de Cd (II) y Cu (II). Todas estas observaciones sugieren que los sistemas de tráfico de proteínas intracelulares representan objetivos relevantes y prometedores para la ingeniería de nuevas cepas fúngicas con una tolerancia tóxica a metal / metaloide alterada.

La afluencia de metales pesados a través de los transportadores de micronutrientes metálicos se puede bloquear complementando los medios de cultivo con altas concentraciones de iones esenciales como Zn (II), lo que conduce a la eliminación del transportador de zinc Zrt1p. Desde el punto de vista del estudio biotecnológico, la variación del contenido metálico de los medios de cultivo para dificultar la absorción tóxica de metales / metaloides es siempre una alternativa atractiva a cualquier tipo de manipulación genética de los propios procesos de transporte.

Sin embargo, la sobreexpresión de transportadores que bombean metales / metaloides tóxicos y/o sus quelatos fuera de las células o hacia orgánulos subcelulares (principalmente en las vacuolas) puede representar una herramienta importante en la ingeniería genética de cepas fúngicas resistentes a los metales. Los objetivos potenciales de transportadores de metales incluyen:

- As (III): Transportador de membrana plasmática Acr3p y, paradójicamente, canal de aquagliceroporina Fps1p, que también es probable que realice exportaciones de As (III) y Sb (III)
- Cd (II) y Cu (II): ATPasa de tipo P de la membrana plasmática Pca1p.
- Co (II), Rh (II) y Zn (II): Transportador de Zn (II) vacuolar.
- Fe (II) y Mn (II): Transportador vacuolar Ccc1p.
- Se (IV): Bomba de sulfito de la membrana plasmática Ssu1p.
- Zn (II) y Co (II): transportador de Zn (II) de la membrana vacuolar Zrc1p.
- Complejos de GSH (glutación) del Cd (II), As (III), Hg (II), Pb (II): ATP Ycf1p de unión al dominio de la familia del transportador vacuolar GSH S-conjugado, una fuerte inducción la cual se puede lograr mediante la sobreexpresión Yap1p, el factor de transcripción regulador maestro de la respuesta al estrés oxidativo; Transportador ABC de membrana plasmática Yor1p.
- Complejos de fitoquelatina de Cd (II): transportador de membrana vacuolar HMT1 de tipo dominio de unión a ATP en *Schizosaccharomyces pombe*, aunque es probable que HMT1 sea un transportador de GSH S-conjugado en *Schizosaccharomyces pombe*.

Se puede abordar el problema de la toxicidad del metal citosólico únicamente aumentando la biosíntesis de los quelantes de metales. GSH es un componente clave tanto en la tolerancia al metal pesado como en la defensa del estrés oxidativo (Pócsi, 2011), y su sobreexpresión aumenta la tolerancia tóxica al metal / metaloide. Cuando la γ -glutamylcisteína sintetasa GSH1 de la levadura y la fitoquelatinina sintasa AsPCS1 del ajo (*Allium sativum*) se expresaron solos o simultáneamente en *Arabidopsis thaliana*, las plantas transgénicas acumularon y toleraron Cd y As notablemente bien. Además, las plantas de tabaco transgénico (*Nicotiana tabacum* cv. LA Burley 21) que albergan serina acetiltransferasa de *Escherichia coli* (biosíntesis de Cys), γ -glutamylcisteína sintetasa (GSH biosíntesis) de *Escherichia coli* y fitoquelatina sintetasa

Schizosaccharomyces pombe mostraron un aumento en la producción de tiorbina y una acumulación elevada de Cd (II) en las raíces, pero no en los brotes. Vale la pena señalar que las cepas recombinantes de levadura que producen GSH también se han diseñado utilizando módulos de auto clasificación que contienen el gen GSH1 (*Saccharomyces cerevisiae*, Wang y otros 2007, 2009) o un vector de expresión intracelular con genes de biosíntesis GSH1 y GSH2 (*Picchia pastoris*). Los niveles de GSH intracelular también pueden elevarse considerablemente en la levadura de panadería al sobreexpresar el transportador de Hgt1p GSH, pero dieron como resultado cierta toxicidad celular inducida por GSH, lo que indica la limitación de este enfoque.

2.9. FASES DE CRECIMIENTO DE HONGOS EN PRESENCIA DE METALES PESADOS

Los hongos adoptan un patrón de crecimiento ante la presencia de varios metales pesados. Donde se llegan a observar 5 estados (Anahid *et al.*, 2010):

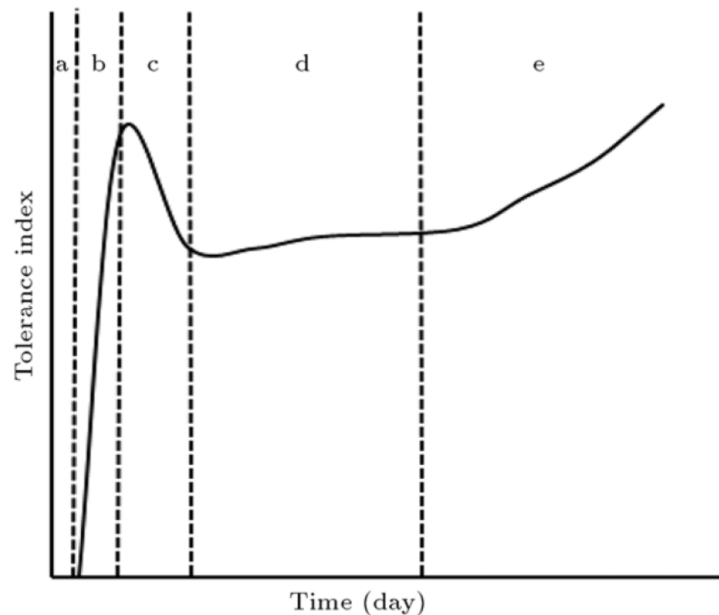


Figura 1. Representación Índice de Tolerancia (IT) vs Tiempo (Anahid *et al.*, 2011)

- (a) La fase lag, lugar donde ocurre el inicio de la inoculación; se observa poco crecimiento o ninguno.
- (b) Crecimiento rápido donde se da el crecimiento inicial del hongo.
- (c) Crecimiento retardado donde la tasa de crecimiento empieza a declinar.
- (d) Crecimiento homogéneo donde la tasa de crecimiento en presencia de metales pesados y el control son similares.
- (e) Crecimiento mejorado en el que la tasa de crecimiento absoluto a menudo excede el control ($TI > 1$)

2.10. ISOTERMAS DE BIOSORCIÓN DE METALES PESADOS EN HONGOS

Según Viraraghavan y Srinivasan (2011), existen modelos para describir los fenómenos de sorción y remoción de varios metales por los hongos. Según la literatura estos muestran un equilibrio de biosorción de los metales pesados y compuestos orgánicos seguidos de isotermas tipo adsorción.

Se ha encontrado que el grado de biosorción de un ion metálico en un biosorbente está en función del equilibrio de la concentración de iones metálicos en solución a condiciones constantes de pH y temperatura.

Los modelos de isotermas de adsorción de solutos individuales que han demostrado describir el equilibrio de biosorción son los modelos de: Langmuir, Freundlich y Brunauer Emmett-Teller (BET).

Modelo de Langmuir, descrito por Weber en el año de 1972:

$$x/m = abCe / (1 + bCe)$$

Donde:

x/m : cantidad de ion metálico biosorbido por unidad de peso de biomasa.

a: Constante relacionada a la energía de entalpía neta de biosorción.

b: cantidad de iones metálicos biosorbido por unidad de peso de biomasa.

Ce: concentración de equilibrio de iones metálicos en solución después de la biosorción.

El modelo de Langmuir está basado en la suposición de que la máxima adsorción ocurre cuando una monocapa saturada de moléculas de soluto está presente en la superficie del adsorbente, y la energía de adsorción es constante y no hay migración de moléculas adsorbentes en el plano superficial.

Modelo de Freundlich, descrita por Weber (1972):

$$Q = K C_e^{1/n}$$

Donde:

Q: Capacidad de adsorción de la biomasa.

K: Constante de equilibrio de biosorción indicativa de la capacidad de biosorción de adsorción del biosorbente.

n: Constante de equilibrio de biosorción.

Ce: Equilibrio de la concentración de iones metálicos.

El modelo de Freundlich es básicamente empírico y fue desarrollado para superficies heterogéneas. El modelo es un medio útil para la descripción de datos.

Modelo Brunauer Emmett-Teller (BET), descrita por Weber (1972):

$$C_e / (C_s - C_e) = 1/BQ^* + ((B - 1)/BQ^*) (C_e/C_s)$$

Donde:

Cs: Concentración de saturación del ion metálico.

Q*: Cantidad adsorbida por unidad de peso de biomasa para la biosorción monocapa.

B: Constante relacionada a la energía de interacción de la superficie.

El modelo de Isoterma BET representa una adsorción multicapa en la superficie adsorbente y se supone que se aplica una isoterma Langmuir a cada capa. Un ejemplo es para la biosorción contribuida con la precipitación y cristalización, la cual puede ser explicada con el uso de la isoterma BET.

Los modelos de adsorción descritos arriba fueron desarrollados para la adsorción de gas en superficies. La aplicación de estos modelos a sistemas biológicos complejos no puede aún explicar por completo el comportamiento de la biosorción. La aplicabilidad de los modelos podría ser considerado una representación matemática del equilibrio de biosorción sobre un rango dado de concentraciones de iones metálicos. A pesar de las limitaciones que puedan presentar estos modelos, pueden proporcionar información acerca de las capacidades de captación de metales y las diferencias en la captación de metales.

2.11. ELUCIÓN DE METALES BIOSORBIDOS

Se ha reportado que los metales pueden ser recuperados de los biosorbentes utilizando soluciones ácidas o básicas, tales como el HCl (10 mM) con el cual se puede recuperar iones metálicos a partir de procesos de biosorción de Hg y Cd con las cepas inmovilizadas de *Phanerochaete chrysosporium*, que tiene eficiencias de hasta 97% de recuperación de estos metales (Kacar *et al.*, 2002). Han sido probados varios eluyentes para la recuperación de Pb, Cd, Ni y Zn de cepas pre-tratadas de *Mucor rouxii*. El HNO₃ ha mostrado ser un eluyente más efectivo que el CaCl₂ y NaCl con más del 90% de elución para los cuatro metales mencionados anteriormente (Yan y Viraraghavan, 2003). El uso de ácidos minerales como eluyentes ha sido ampliamente estudiado (Kapoor & Viraraghavan 1997), se ha demostrado los ácidos HNO₃ y HCl pueden desorber más del 80% de Pb de biomasas no vivas de *Rhizopus nigricans* (Zhang *et al.*, 1998). Así como también el uso de NaOH permitió la recuperación de la capacidad de biosorción inicial de Pb, Cd, Ni y Zn de cepas pre-tratadas de *Mucor rouxii*. La regeneración

caustica disminuye la protonación y sustituye los iones de sodio en los grupos funcionales. Existen otros eluyentes menos agresivos que disminuyen el daño de los biosorbentes, entre ellos se encuentran soluciones de cloruro de calcio 0.1M y sulfato de magnesio que son capaces de eluir Cd y Ni biosorbidos por *Aspergillus niger* (Kapoor & Viraraghavan 1997).

2.12. IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS

En la actualidad el uso de herramientas moleculares y el aporte del estudio del genoma, han contribuido a cambios en la taxonomía de géneros y especies y a nuevos establecimientos entre los grupos taxonómicos de los microorganismos incluyendo los hongos.

La taxonomía de los hongos filamentosos y las levaduras pasaron por dos periodos (Ratón, 2004), el primero caracterizado por un fuerte estudio de la morfología comparativa, la fisiología y la genética convencional y una segunda etapa, que se extiende hasta la actualidad, que consiste por una ampliación de los estudios de morfología al nivel ultramicroscópico, la aplicación de criterios bioquímicos y la introducción de los estudios de la Biología Molecular (Guarro *et al.*, 1999). Entre los principales aportes de la segunda etapa se destacan la diferenciación por microscopía electrónica de transmisión de las fases levaduriformes de los ascomicetes y basidiomicetes y la aplicación de los perfiles de ácidos nucleicos para la identificación de géneros, especies de las cepas fúngicas, mediante las técnicas de secuenciación de ADN/ARN, cariotipado y el estudio de los patrones de restricción de los ARNs (Ratón, 2004).

La taxonomía clásica de hongos se apoya en técnicas convencionales basadas en la descripción morfológica y fisiológica de especies y géneros, pero éstas dependen de las condiciones de cultivo de las cepas. A lo largo de la historia, la nomenclatura basada en las características fenotípicas ha producido ambigüedad en la ubicación taxonómica de

algunos hongos y han dado origen al fenómeno de la dualidad de la nomenclatura que no es más que una misma especie sea nombrada de una forma en el estado vegetativo (anamorfo) y de otra en el estado sexual (teleomorfo), así como los holomorfos, además una de las limitaciones de solo usar dicha técnica es que no puede aplicarse a los hongos que no crecen en cultivo. Estas dificultades se han solucionado con la aplicación de las técnicas moleculares, basadas en el análisis de fragmentos de las moléculas de ácidos nucleicos (Guarro *et al.*, 1999; Ratón, 2004).

La taxonomía de los hongos es algo compleja debido a la plasticidad morfológica y fisiología intraespecífica, así como a la existencia de un número limitado de marcadores morfológicos y fisiológicos, además puede consumir mucho tiempo. Se han desarrollado marcadores para la identificación de hongos, pero, es necesario el uso de uno o más para tener seguridad. Es necesaria la secuenciación de los genes ribosomales (ADNr) y de sus espacios transcriptos internos (ITS, Internal Transcribed Spacer) u otras regiones variables dentro de los genes conservados, como el gen de la actina para una identificación precisa (Slemmons *et al.*, 2013).

Las regiones ITS (no codificantes y variables) son útiles para medir relaciones genealógicas cercanas de hongos, dado que existen grandes diferencias interespecíficas (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). En la Figura 3, se observa algunos de los cebadores utilizados para amplificar dicha región.

El ADN que codifica para ARN ribosomal (ARNr) está organizado en unidades que se repiten cientos de veces a lo largo del genoma (Figura 2). Cada unidad está formada por tres genes, uno que codifica para la subunidad 18S, uno que codifica para la subunidad 5.8S y otro que codifica para la subunidad 26S. Los genes están intercalados a su vez por secuencias no codificantes denominadas ITS1 e ITS2, y a su vez cada unidad está separada por otra región denominada IGS (Inter Genic Spacer), intercaladas

por el gen 5S. Estas regiones son lo suficientemente variables para ser utilizadas como una región blanco específica de especie (Slemmons *et al.*, 2013).

Las regiones ribosomales evolucionan de una manera concertada, muestran un bajo polimorfismo intraespecífico, y una gran variabilidad interespecífica (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).

El dominio D1/D2 del ARNr 26S es una región altamente variable, con diferencias entre especies de hasta una sola base. Dicha región ha permitido separar todas las especies de ascomicetes de fase levaduriforme existentes, incluso las altamente relacionadas (Ratón, 2004). Las secuencias de la subunidad mayor 26S ADNr, especialmente la región D1/D2, ha sido aplicada al estudio de la filogenia de diferentes grupos de levaduras como una importante herramienta en la identificación de levaduras (Couto *et al.*, 2005).

En el caso de levaduras está establecido que diferencias mayores al 1% en la región D1/D2 determinan que dos cepas pertenecen a especies diferentes (Guarro *et al.* 1999; Valverde 2003). No existen datos similares para hongos filamentosos. Como se mencionó anteriormente, para asegurar la identificación se analiza más de un gen y se espera que los resultados sean concordantes, o se utiliza una identificación polifásica.

La taxonomía polifásica, término acuñado por Colwell (1970), es la herramienta comúnmente utilizada en la delimitación de los taxones a todos los niveles, siendo su característica distintiva la utilización de diversas técnicas, tanto moleculares como fenotípicas, que permiten llevar a cabo dicha delimitación (Valverde, 2003). Dentro de los criterios genéticos, la taxonomía polifásica incluye, en particular, la secuenciación de la subunidad pequeña del ARN ribosómico y la hibridación genómica (Madigan *et al.*, 2003).

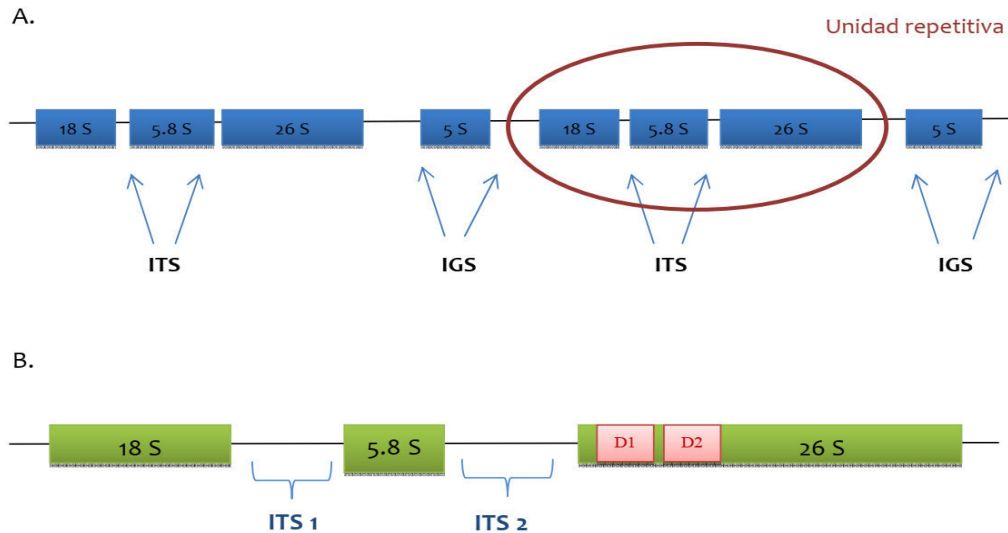


Figura 2. Representación sintetizada de las regiones de ADN ribosomal, para los estudios de identificación molecular en hongos. **A).** Región del ADN que codifica para el ARN ribosomal (ARNr). **B)** Detalle de una unidad repetitiva de las múltiples copias que poseen los hongos. (González, 2014; Vilgalys Mycology Lab, 2018)

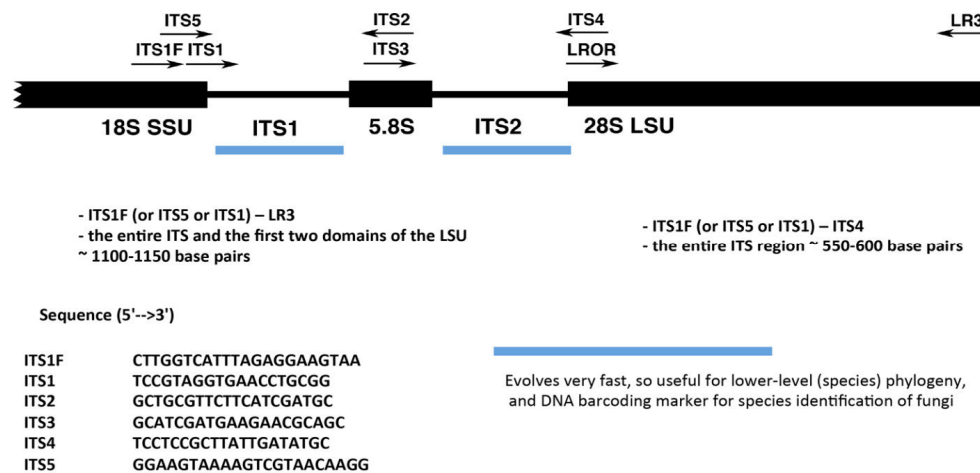


Figura 3. Cebadores utilizados para la amplificación de la región ITS (Raja *et al.*, 2017).

En términos filogenéticos, el reino de los hongos es un grupo monofilético. De manera simplificada el árbol biológico de los hongos puede describirse en cinco filos: Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota y Basidiomycota (Moore, 2011).

El laboratorio Vilgalys Mycology perteneciente a la Universidad de Duke (EEUU), a lo largo de los años ha compilado una lista útil de secuencias de cebadores conservados útiles para la amplificación y secuenciación del rDNA nuclear de la mayoría de los principales hongos.

3. HIPÓTESIS

Hongos filamentosos aislados de cuerpos de agua Altoandinos contaminados con relaves mineros tienen capacidad de biosorción de metales pesados.

VARIABLES

Variables independientes:

Temperatura, pH, concentración inicial de metales.

Variable dependiente:

Capacidad de biosorción de metales por la biomasa fúngica.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general:

Evaluar la resistencia y capacidad de biosorción de Cr VI y Cd II por hongos filamentosos aislados de cuerpos de agua Altoandinos contaminados con relaves mineros de las regiones de Junín y Cerro de Pasco.

4.2. Objetivos específicos:

- Aislar hongos filamentosos de las lagunas Altoandinas contaminadas con relaves mineros.
- Determinar la resistencia de los hongos aislados frente a altas concentraciones de iones Cromo VI y Cadmio II.
- Identificar fenotípica y/o molecularmente a los hongos filamentosos aislados.
- Evaluar el crecimiento de las cepas seleccionadas a diferentes temperaturas.
- Evaluar el crecimiento de las cepas seleccionadas a diferentes pH.
- Evaluar a escala de laboratorio la capacidad de biosorción de Cromo VI y Cadmio II.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Localización de la zona de muestreo

Las zonas de muestreo corresponden a cuerpos de agua Altoandinos (lagos, lagunas y ríos) que se encuentran ubicados en la cabecera de Cuenca del Río Rímac y en la cuenca del Mantaro (Sierra central de Junín y Pasco). El mapa de la zona de muestreo se observa en la Figura 25 (Anexo).

Cada punto de muestreo fue Georreferenciado en coordenadas UTM (WGS 84) y la altitud en metros sobre el nivel del mar (msnm), mediante el uso de GPS (GARMIN eTrex® 30).

5.2. Muestreo

Las muestras de agua se tomaron en envases de 1000 mL limpios, lavados, esterilizados, etiquetados y conservados adecuadamente. La toma de muestra se realizó a una profundidad aproximada de 40 cm en la columna de agua de acuerdo al protocolo descrito por la Autoridad Nacional del Agua (2011).

5.3. Muestras

Consisten en 6 muestras de agua y sedimento tomadas de los siguientes cuerpos de agua: río San Juan, relavera Yanamate, relavera Carhuacayan, relavera Huarón, relavera Milpo y laguna Santa Catalina. Las muestras fueron guardadas en recipientes para su transporte y conservando en la cadena de frío.

La caracterización de metales pesados de las muestras ambientales se encuentra en la Tabla 7 (Anexo) y fue realizada por el Instituto de Corrosión y protección de la Pontificia Universidad Católica del Perú mediante el método de ICP-Masas

5.4. Determinación de los parámetros físico-químicos

Para cada lugar de muestreo se midieron los siguientes parámetros fisicoquímicos: temperatura (°C), pH, sólidos disueltos totales (SDT-ppt) y conductividad (CE: en mS/cm), los cuales son mostrados en la Tabla 6 (Anexo)

Las mediciones de los parámetros fueron medidas *in situ* de acuerdo a lo descrito en el Protocolo de monitoreo de la calidad de los recursos hídricos de la Autoridad

Nacional del Agua (2011), la toma de muestra fue a una profundidad aproximada de 40 cm en la columna de agua y las medidas mediante el uso de un equipo multiparámetro EXTECH modelo DO700 previamente calibrado.

5.5. Aislamiento de hongos filamentosos

5.5.1. Siembra en medio líquido

Para obtener una mayor población de microorganismos, se colocó 10 mL de cada muestra en matraces de vidrio conteniendo 90 mL de caldo YPG (Yeast Peptone Glucose) y también en 90 mL de caldo Medio Mínimo de Davis (cuyos componentes se encuentran en el Anexo 1), se ajustaron a dos pH diferentes (tanto a pH 3,5 y pH 4,5) para cada muestra, se incubó a temperatura ambiente y a 10 °C, con una agitación de 150 RPM, hasta 3 semanas.

5.5.2. Aislamiento en medio sólido de los hongos filamentosos

La purificación de las colonias se llevó a cabo en Agar YPG y agar Mínimo de Davis pH 3,5 y pH 4,5. La preparación de dichos medios se realizó en recipientes separados, el primer recipiente contiene solo agar, y el otro el resto de componentes (ajustado dos diferentes pH: pH 3,4 y pH 4,4), para luego autoclavarlos a una presión de 15 libras y una temperatura de 121 °C, se mezclaron ambos recipientes antes de verter el medio a las placas Petri, en baño maría a 46 °C. Para el aislamiento se utilizó el método de agotamiento en placa, y se realizó por duplicado. De ser necesario se realizó un segundo enriquecimiento en caldo YPG en las condiciones descritas con el fin de adaptar los cultivos *in vitro*.

5.5.3. Conservación de las cepas

Las cepas aisladas se conservaron en tubos conteniendo agar YPG en plano inclinado y se almacenaron a 4 °C. También se sembraron en tubos eppendorf conteniendo medio YPG, donde luego del crecimiento se agregó 1 ml de glicerol 100%, y se almacenaron a – 20°C.

5.6. Preparación de soluciones Stock de metales Cr VI y Cd II

Los cationes metálicos fueron preparados a partir de las siguientes sales: El Cr (VI) a partir de $K_2Cr_2O_7$ y el Cd (II) a partir de $CdSO_4$. Se prepararon soluciones patrones de 10000 ppm, los cuales fueron almacenados en frascos oscuros a temperatura ambiente (García, 2004). Las concentraciones de los metales fueron ajustadas en laboratorios acreditados.

5.7. Identificación morfológica de los hongos aislados

La ubicación taxonómica de los hongos se basó en la caracterización macroscópica de las colonias. Anverso: forma, color, tamaño, consistencia, elevación, margen; reverso: color, presencia de pigmento y las características microscópicas: forma, color y tamaño. Fueron cultivados en medio APD, pH 5.5 e incubados a temperatura ambiente durante 2 semanas. Se realizaron microcultivos para definir las características de hifas, esporas y estructuras especializadas de las cepas, las cuales se observaron mediante el montaje en lámina con azul de lactofenol (Koneman *et al.*, 1999; García 2004).

5.8. Tasa de crecimiento de los hongos filamentosos en medio sólido

El diámetro fue determinado realizando el promedio de tres medidas de la colonia en intervalos de 24 horas. La tasa de crecimiento fúngico en placa se expresó como $mm\ d^{-1}$ (milímetro por día), es decir se calculó dividiendo los valores promedios del crecimiento fúngico entre el número de días incubados. Para tener datos homogéneos se tomó como referencias las medidas que se encuentran en región exponencial de la curva de crecimiento fúngico (Maheshwari, 2002).

La tasa de crecimiento fúngico fue calculada de la siguiente manera:

$$\text{Tasa de crecimiento fungico (mm d}^{-1}\text{)} = \sum \frac{(Cf-Ci)}{n}$$

Donde:

Cf: Crecimiento diametral final (mm)

Ci: Crecimiento diametral inicial (mm)

n: Número de días incubados (d)

5.9. Preparación del inóculo para las pruebas en medio líquido.

El inóculo consistió de una cantidad determinada de conidios por ml, obtenido a partir de un cultivo fúngico. Según como describe García (2012), se adicionó tween 80 al 0,05% (agente tensionante) a los frascos con Agar Czapek pH 5.0, que contienen las cepas seleccionadas, para de esa manera desprender las conidias de la superficie de la colonia, luego se realizó un conteo de conidios en cámara de Neubauer hasta obtener aproximadamente entre 1×10^6 conidios/mL a 1×10^7 conidios/mL. Se pueden conservar los conidios en tubos con agua destilada. Los inóculos se cultivaron en un agitador rotatorio a 25 °C y a 150 rpm, durante 96 h (Hernández 2011).

5.10. Prueba de tolerancia y/o resistencia de Cr VI y Cd II.

Se realizó esta prueba para seleccionar las cepas más tolerantes y/o resistentes. De acuerdo a García (2004), los ensayos se realizaron en tubos de vidrio conteniendo caldo YPG a pH 3,5 y pH 4,5 con concentraciones desde 50 a 1000 ppm de los metales: Cr VI y Cd II, para seleccionar y determinar la concentración mínima del metal que inhiba el crecimiento microbiano. Los tubos fueron inoculados con 1/10 (V/V) de la suspensión de conidios con una concentración de 1×10^6 conidios/ml de las cepas aisladas.

Paralelamente se llevó a cabo experimentos controles:

- a) Medio de cultivo con suspensión de conidios del hongo, en ausencia de la solución de metal.
- b) Medios de cultivo con las diferentes concentraciones del metal sin inóculo.

5.11. Crecimiento en placa a diferentes temperaturas

Las preferencias de temperaturas fueron evaluadas para lo cual se inoculó en el centro de la placa discos de agar de 9 mm de diámetro con presencia de micelios jóvenes en crecimiento, incubando las cepas que presentaron mayor resistencia a metales pesados en agar YPG pH 5.5 en placas, en temperaturas de 6, 20, 25, y

30°C por 14 días. Los diámetros de las colonias fueron medidas periódicamente.

Las pruebas se realizaron por triplicado (Selbmann *et al.* 2008).

5.12. Crecimiento en placa a diferentes pH

Los crecimientos de las hifas a diferentes valores de pH fueron evaluados en agar YPG a pH 2, 3, 4, 5 y 6. Las cepas fueron inoculadas en el centro de cada placa con discos de agar de 9 mm de diámetro con presencia de micelios jóvenes en crecimiento, e incubadas a 25 °C por 14 días, monitoreando el diámetro de la colonia. Las pruebas se realizaron por triplicado (Yamazaky *et al.* 2010).

5.13. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se observó la resistencia en placa, empleando el medio YPG con diferentes concentraciones de metales en tres cepas seleccionadas, para lo cual se inoculó discos de agar de 9 mm de diámetro con presencia de micelios jóvenes en crecimiento, se evaluó por triplicado e incubó a temperatura ambiente (aprox. 25 °C), se midió el crecimiento de la colonia desde el punto de inoculación hasta el final de la hifa más larga cada 24 h hasta llegar a 168 h de incubación. El control negativo utilizado será el medio sin agregar el metal. La concentración mínima inhibitoria es definida como la concentración más baja de metal que inhibe el crecimiento de la cepa aislada (Ezzouhri *et al.* 2009; Liyana *et al.* 2011).

El índice de tolerancia (IT) fue calculado como del crecimiento fúngico en presencia de metales, dividido entre el crecimiento fúngico del control. (Anahid *et al.*, 2010).

5.14. Curva de crecimiento de los hongos filamentosos en medio líquido

Una vez seleccionadas las cepas por su capacidad de resistencia, se realizó la curva de crecimiento de los hongos seleccionados. En primer lugar, se realizó un conteo de conidios en cámara de Neubauer, para obtener un inóculo aproximado de 1×10^7 conidios/ml, luego dicha suspensión de conidios se agregó en matraces conteniendo caldo Czapek modificado, cuyos componentes se encuentran en el Anexo 1, ajustado a pH 5.0 y se incubaron a 25 °C, mantenidos en agitación a 150 rpm por 240 horas.

A partir de los matraces con las cepas en crecimiento, se tomaron 10 mL de muestras en 5 tiempos diferentes (a las 48, 96, 144, 192, 240 horas), luego para obtener los micelios, las muestras fueron filtradas a través de papel filtro Whatman N° 40 (retención de partículas de 8 µm) previamente secado y pesado, esto con ayuda de un equipo de filtración a vacío. Para obtener los valores de biomasa, se pesó la biomasa retenida en el papel filtro (biomasa húmeda), y se colocó en el horno a 70 °C por 8 a 12 horas para obtener el peso de biomasa seca.

Se graficó la curva de crecimiento entre el peso seco de la biomasa (g/L) versus el tiempo de incubación (h). El resultado se reportó en $g_{\text{peso seco}} / L_{\text{medio}}$. Los experimentos se realizaron por triplicado (Larralde 1996; Vieira *et al.* 2008; Zelayarán *et al.*, 2013).

5.15. Biosorción de Cr VI y Cd II por biomasa viva en medio de cultivo

Los ensayos de biosorción de las cepas seleccionadas: *Trichoderma asperellum* (MRYP4) y *Trichoderma* sp (MRMP1), se realizaron en matraces Erlenmeyer conteniendo 700 ml de caldo Czapek modificado, con pH 5.0, y en concentraciones menores a 50 ppm, que fue donde presentaron mejor crecimiento en las pruebas de resistencia a Cr VI y Cd II (CMI).

Los matraces fueron inoculados con 10% (v/v) de una suspensión de conidios (aprox. 1×10^7 conidios/mL), se incubaron a 25 °C y se mantuvieron en agitación a 150 rpm respectivamente, se tomaron volúmenes del matraz en 5 tiempos (36, 60, 84, 108, 132 horas) (Duca *et al.*, 2009; Chatterjee, 2006).

Los volúmenes tomados en cada tiempo se filtraron en un equipo de filtración a vacío a través de un papel filtro Whatman N° 40, que tiene una retención de partículas de 8 µm (previamente secado y pesado) y el sobrenadante fue utilizado para la determinación de la concentración del metal (Chatterjee, 2006).

El porcentaje de biosorción (%) fue calculado como:

$$R = 100 \times (C_i - C_f) / C_i$$

Dónde:

R: Remoción de metales pesados (%)

C_i es la concentración inicial del metal en la solución (ppm)

C_f es la concentración final del metal en la solución (ppm).

5.16. Biosorción de Cd II por biomasa viva en solución acuosa

La biomasa de *Trichoderma asperellum* (MRYP4), se cultivó en Caldo Czapek modificado, adicionado con 10 g/L de extracto de malta, a un pH 5,0. El procedimiento de biosorción se adaptó de Kapoor (1998) y Zafar *et al.* (2006) con algunas modificaciones.

El hongo se cultivó en forma filamentosa durante 108 horas, en matraces, con una agitación de 150 rpm. La biomasa fue cosechada por filtración través de un papel filtro Whatman N° 40, luego esta se lavó con agua desionizada para eliminar el medio de crecimiento residual. La biomasa lavada (biomasa viva) se usó inmediatamente después. Se agregaron aproximadamente 5 g de biomasa húmeda de *Trichoderma asperellum* (MRYP4) que fue añadido a 100 ml de solución metálica que contiene 10.3, 20.5 y 40.4 ppm de $CdSO_2$ en solución salina 0.85%, a pH inicial de 5,0 en un matraz de 250 ml. Los frascos se agitaron a 150 rpm durante 1, 3 y 5 horas a 25°C. Se eligió la selección del valor de pH inicial y el tiempo de contacto por los resultados previos y basados en una revisión de la literatura (Kapoor y Viraraghavan, 1995; Yan y Viraraghavan, 2000).

Se midió el sobrenadante y el control (solución metálica sin biomasa) mediante espectrofotometría de absorción atómica. Todas las muestras fueron analizadas en triplicado. La Capacidad de biosorción, es decir, la cantidad de metal los iones (mg) de Cd biosorbidos g^{-1} de biomasa se calcularon utilizando siguiente ecuación:

$$Q = \left(\frac{C_f - C_i}{s} \right) v$$

Dónde:

Q: mg de ion metálico biosorbido por g de biosorbente

C_i : Concentración de iones metálicos inicial (mg/L)

C_f: Concentración de iones metálicos final (mg/L)

s: Peso seco del biosorbente en la solución de mezcla de reacción (g)

V: Volumen de la solución de mezcla de reacción (L).

5.17. Análisis de los metales pesados

Las determinaciones de los metales pesados se evaluaron por el método de espectroscopia de absorción atómica (EAA) (Chatterjee 2006). Y fueron realizados por MINLAB (Mineral of Laboratories), y el Laboratorio de Análisis de Suelos, de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Todos los materiales utilizados para los experimentos con metales pesados, fueron sumergido por 12 horas en una solución de ácido sulfúrico al 10 % y posteriormente enjuagados con agua destilada, con la finalidad de eliminar cualquier residuo de metales en los materiales a usar (Hernández 2011; NOM-147-SEMARSAT/SSA1-2004).

5.18. Identificación Molecular de Hongos.

La metodología para la identificación molecular consiste en primer lugar extraer el ADN, luego la amplificación por PCR de la región de interés y finalmente la secuenciación de los productos amplificados. De acuerdo a ello, se desarrolló la metodología realizando modificaciones a lo descrito por Lurá *et al.* (2003) y Doyle y Doyle (1990), y se realizó tal como se describe a continuación:

5.18.1. Reactivación de las cepas

Las cepas fueron reactivadas en Medio Mínimo de Davis modificado (MMD), cuyos componentes están descritos en el Anexo 1, con un pH 4.5, para ver la pureza de sembró por puntura en Agar YGP pH 5.5 y luego se inoculó por asadas nuevamente en Caldo MMD pH 4.5, se incubó por 3 a 5 días a 120 RPM y temperatura ambiente hasta observar crecimiento.

5.18.2. Lavado celular

Luego del tiempo de crecimiento, se filtró la biomasa en papel Whatman N°1 (tamaño de poro 11 µm), luego se colocó el pellet en tubos de centrifuga de 1.5 ml,

se resuspendió el pellet en 500 µl de solución de lavado (80% Metanol reducido con 20% de buffer TE 20:1 (Tris-EDTA) (v/v)) para ayudar a precipitar la biomasa fúngica y se centrifugó a 5000 RPM por 10 minutos, se decantó, y se repitió el procedimiento dos veces más. Se secó el pellet en horno a 37 °C por 1 hora.

5.18.3. Extracción de ADN

La extracción de ADN consiste de tres etapas. La primera etapa de lisis celular, la segunda de purificación y la tercera de recuperación del ADN.

5.18.3.1. Ruptura de las células

La lisis celular en hongos implica la ruptura de la pared celular y de la membrana plasmática. La pared celular fúngica consiste de capas de quitina (1-3)-β-D-glucano, (1-6)-β-glucano, lípidos y proteínas, además podría presentar una rígida capa superficial de melanina, estas características han impedido el desarrollo de un método único y universal de extracción de ADN para hongos filamentosos, desarrollándose para ello métodos físicos, químicos o enzimáticos (Karakousis *et al.*, 2006).

A un tubo eppendorf de 1.5 ml, se añadió aproximadamente 700 mg de la biomasa húmeda previamente lavada (biomasa a la altura de la marca de 90 µl del tubo eppendorf), y luego se añadió 150 µl de Buffer de lisis de hongos (1M Sorbitol, 0.1M EDTA pH=7.4, 0.1% B-mercaptoethanol, 50 unidades de liticasa), se disgregó la biomasa con ayuda de un estilete limpio. Se incubó a 30° C, mínimo 1 hora. Luego se agregó 295 µl de buffer TE (10:1) y 5 µl proteinasa K, se disgregó una vez más. Se incubó a 60 °C, durante la noche (*overnight*).

5.18.3.2. Eliminación de proteínas

Para esta etapa se utiliza solventes orgánicos (fenol, cloroformo), para separar las proteínas.

Se agregó 500 µL de una solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) al tubo eppendorf que contiene la biomasa con el buffer, y que fue previamente incubado

toda la noche. Se homogenizó 2 minutos. Se centrifugó a 13000 RPM por 15 minutos a 4 °C, y se recuperó el sobrenadante y colocó en tubos eppendorf nuevos.

5.18.3.3. Precipitación del ADN

Finalmente, la recuperación del ADN se logra mediante precipitación en condiciones adecuadas. La presencia de sales neutraliza la carga negativa del ADN, volviéndolo insoluble en etanol o isopropanol y favoreciendo su precipitación (Fredricks *et al.* 2005).

Se agregó un volumen equivalente (respecto al recuperado en el paso anterior) de isopropanol frío a los tubos eppendorf y se homogenizó e incubó en frío (-20 °C) por 2 horas. Se centrifugó a 13000 por 20 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante. Se Lavó el pellet con 500 µL de etanol (70%)-Tris EDTA 20:5 (30%) (v/v), se mezcló por inversión de 4 a 5 veces el tubo, se dejó reposar por 5 minutos y se centrifugó a 10000 RPM por 15 minutos, se decantó y luego se agregó 500 µL de etanol (70%)-Tris EDTA 20:1 (30%) (v/v), se mezcló por inversión de 4 a 5 veces, se dejó reposar por 5 minutos y se centrifugó a 10000 RPM por 15 minutos, se decantó y por último se agregó 500 µL de etanol 70%, se mezcló por inversión de 4 a 5 veces, se dejó reposar por 5 minutos y se centrifugó a 10000 por 15 minutos, se decantó. Se dejó secar los tubos eppendorf a 50 °C por 6 horas. Resuspender el ADN en 100 µL de buffer TE (20:1). Incubar una hora a 37 °C por 1 hora. Guardar a -20 °C.

5.18.4. Condiciones PCR

En la PCR (Polymerase Chain Reaction), se utiliza un ADN molde, dos cebadores oligonucleótidos (cebadores), desoxinucleótidos y una enzima termoestable con actividad polimerasa. La reacción transcurre a través de una serie de ciclos repetitivos (Desnaturalización, Hibridación y elongación del ADN).

Se usaron los cebadores universales ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3') e ITS-4 (5'-CCTCCGCTTATTGATATGC-3') para amplificar regiones de secuencia ITS1-5.8S-ITS2 (ITS: Internal Transcribed Spacer). Las condiciones PCR fueron como sigue: 95 °C por 5 minutos; 32 ciclos: 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s y 72 °C

por 1 minuto; 72 °C por 7 minutos y pausa de 4 °C. El producto de amplificación (amplicón) será purificado y enviado a Molecular Cloning Laboratories-MCLAB, <https://www.mclab.com/> (San Francisco, U.S.A.) para el Secuenciamiento. La secuencia de genes ITS fueron comparadas con secuencias conocidas en la base de datos del GenBank para identificar la secuencia con mayor similitud y analizadas con la herramienta BLAST (Zeng *et al.* 2013).

La sensibilidad final de cualquier ensayo de PCR para la detección de hongos depende de una lisis eficiente de las células fúngicas y de la purificación del ADN, la cual debe estar libre de inhibidores de la PCR (Karakousis *et al.*, 2006).

5.19. Análisis de datos

Los resultados obtenidos de la medición del crecimiento de las cepas fúngicas y la concentración de los metales, se analizaron estadísticamente para obtener las gráficas y la desviación estándar, mediante Microsoft Excel 2016 y el programa MINITAB 17.1.0 (2013).

6. RESULTADOS

6.1. Caracterización fisicoquímica de las muestras

En la Tabla 6 (Anexo) se muestra los datos de la georreferenciación (UTM) de la zona de muestreo y las condiciones fisicoquímicas de las muestras, las cuales fueron realizadas *in situ*, y en la Tabla 7 (Anexo) se muestran los resultados de la caracterización de metales pesados de las muestras, mediante el método ICP-MS. Observándose que las muestras superan al menos un valor de un tipo de metal pesado, establecido en los ECA (Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM-Categoría 4).

6.2. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos

Se aislaron en total 20 cepas de hongos (Tabla 1), a partir de las muestras de agua tomadas en las zonas descritas en la Tabla 6 (Anexo), tomando en cuenta para el aislamiento que los medios de cultivo (Figura 5) presenten un pH bajo, como en las que

se encontraban las muestras (pH 3,5 y pH 4,5). En el medio de aislamiento también crecieron levaduras y la presencia de ellas fue mayor que de los hongos filamentosos.

6.3. Identificación fenotípica y molecular de los hongos aislados.

Se utilizó una identificación polifásica, es decir tanto por métodos moleculares y fenotípicos. En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos por la identificación fenotípica y molecular. De las 20 cepas aisladas se identificaron 19 cepas fúngicas, de las cuales 5 de ellas fueron identificadas hasta especie *Mucor racemosus* (MSJJ1), *Trichoderma koningiopsis* (MSCJ3), *Trichoderma asperellum* (MRYP4), *Acidothrix acidophila* (MRYP5) y *Galactomyces candidum* (MSJJ2)) mediante el uso del marcador universal ITS 1 e ITS4, adicionalmente se usó el marcador LSU D1/D2 del gen rRNA 26S para la identificación de las cepas MCJ1 y MRYP2 correspondientes al género *Penicillium*.

Tabla 1. Relación de cepas aisladas de los cuerpos de agua contaminados con relaves mineros e identificación fenotípica y molecular mediante los marcadores ITS1-ITS4 y LSU.

SALIDA DE CAMPO	Nº	PROCEDENCIA	CODIGO	GÉNEROS Y/O ESPECIES	% SIMILITUD	Nº DE ACCESO
I	1	Relavera Yanamate	MRYP1	<i>Penicillium</i> sp 1 *	-	MG018371
	2	Minera Carhuacayan	MCJ1	<i>Penicillium</i> sp 2	100%	MK381247
	3	Minera Carhuacayan	MCJ2	<i>Penicillium</i> sp 3	100%	MK381248
II	4	Relavera Huarón	MRHP1	<i>Penicillium</i> sp 4	100%	MK381249
	5	Relavera Yanamate	MRYP2	<i>Penicillium</i> sp 5 *	-	MG018372
	6	Relavera Milpo	MRMP1	<i>Trichoderma</i> sp	99%	MK381250
	7	Laguna Santa Catalina	MSCJ1	<i>Penicillium</i> sp 6	100%	MK381251
	8	Laguna Santa Catalina	MSCJ2	<i>Penicillium</i> sp 7	100%	MK381252
III	9	Relavera Yanamate	MRYP3	<i>Geotrichum</i> sp**	-	
	10	Relavera Milpo	MRMP2	<i>Penicillium</i> sp 8	100%	MK381253
	11	Relavera Milpo	MRMP3	<i>Penicillium</i> sp 9	100%	MK381254
	12	Río San Juan	MSJJ1	<i>Mucor racemosus</i>	99%	MK381255
	13	Laguna Santa Catalina	MSCJ3	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	99%	MK381256
	14	Relavera Yanamate	MRYP4	<i>Trichoderma asperellum</i>	100%	MK381257
	15	Relavera Yanamate	MRYP5	<i>Acidothrix acidophila</i>	99%	MK381258
	16	Río San Juan	MSJJ2	<i>Galactomyces candidum</i>	99%	MK381259
IV	17	Relavera Yanamate	MRYP6	<i>Penicillium</i> sp 10	99%	MK381260
	18	Relavera Yanamate	MRYP7	N.I.	-	
	19	Relavera Yanamate	MRYP8	<i>Penicillium</i> sp 11	100%	MK381261
	20	Relavera Yanamate	MRYP9	<i>Aspergillus</i> sp	100%	MK381262

Leyenda:

N.I.: No identificada.

(*): Cepas identificadas por marcadores LSU D1/D2 del gen rRNA 26S.

():** Cepa identificada por técnica de Microcultivo.

Todas las demás cepas fueron identificadas mediante los marcadores universales ITS1 e ITS4.

En la Figura 4, se observa los pesos moleculares de los amplicones obtenidos con los marcadores descritos líneas arriba, los pesos moleculares de los hongos se encuentran entre 500pb y 600 pb (pares de bases).

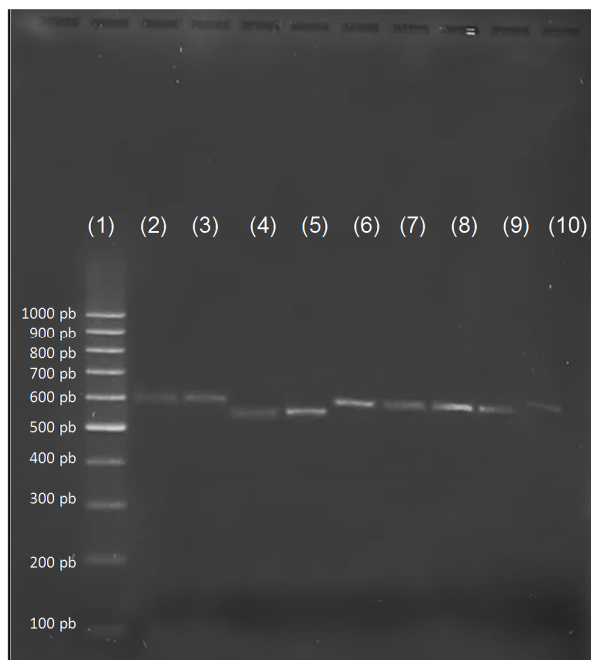


Figura 4. Amplicones de las secuencias PCR obtenidas mediante los marcadores ITS1 e ITS4. De Izquierda a Derecha: (1) *Ladder*, (2) MSCJ3, (3) MRMP1, (4) MRYP1, (5) MRMP2, (6) MRYP2, (7) MRHP1, (8) MSCJ2, (9) MRYP4 y (10) MSJJ1.

En la Figura 5, se representa la distribución de los géneros aislados. El 55% de las cepas aisladas correspondió al género *Penicillium*, el 15% al género *Trichoderma*, y los géneros *Geotrichum*, *Mucor*, *Acidothrix*, *Galactomyces* y *Aspergillus* representaron el 5 % cada uno, un último 5% representa un aislamiento no identificado (N.I.). Las cepas fúngicas se encuentran entre las divisiones Ascomycota y Mucoromycota.

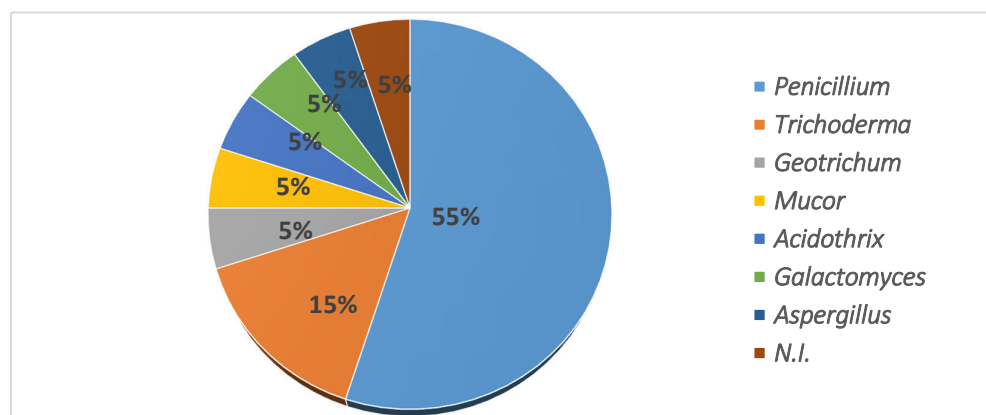


Figura 5. Distribución de los géneros obtenidos en el aislamiento e identificación de los hongos.

6.3.1. Descripción de los géneros representativos.

Los datos obtenidos en la identificación molecular se corroboraron y complementaron con las observaciones macro y microscópicas de las colonias.

Género *Penicillium*

En las Figuras 35, 36, 37, 38, 39, y 40 a), se observan las cepas representativas de este género en agar APD, presentaron colonias de aspecto aterciopelado de colores verdes, azul verdoso debido a las esporas, varias colonias presentaron exudados. En la Figura 41 a), b), c) y d) se observa la vista al microscopio presenta hifas hialinas y tabicadas, conidióforos con aspecto de cepillo, los conidióforos producen métulas que originan fiálides que producen cadenas de conidios (Figura 41).

Género *Trichoderma*

En las Figuras 26, 27, 28 y 29 se observaron las cepas MRMP1, MRYP4 y MSCJ3 en agar APD, presentaron colonias con aspecto aterciopelado, de color blanco que con el tiempo se torna amarillo y verde, con adherencia al vidrio de la placa. En la Figura 41 e), f) y g) se observan las vistas al microscopio, presentan conidias en racimos, ovoides, de paredes lisa y hialinos, los conidióforos se ramifican de forma piramidal, con ramas cortas en las puntas y más largas en la parte inferior, las fiálides nacen en ángulos que llevan racimos dípticos a las conidias, hay presencia de clamidosporas terminales (Figura 41.).

Género *Geotrichum*

En la Figura 33 se observa la cepa MRYP3 en agar APD, presentó colonias de aspecto seco polvoso, de color blanco. En la Figura 41 h) se observa la vista al microscopio, presenta hifas tabicadas que se fragmentan tempranamente en artrosporas rectangulares.

Género *Mucor*

En la Figura 40 b) se observa la cepa MSJJ1 en agar APD, presentó colonias de aspecto veloso-algodonoso, color amarillo a café y superficie elevada. En la Figura 41 l) se observa la vista al microscopio, presenta micelio cenocítico con esporangióforos largos y sin ramificar, esporangios globosos conteniendo a las esporangiosporas.

Género *Acidothrix*

En agar APD la cepa MRYP5 presentó colonias de aspecto aterciopelado, color blanco. En la figura 41 i) se observa la vista al microscopio, presenta micelio granular, conidióforos con o sin ramificaciones, conidios globosos y elipsoides.

Género *Galactomyces*

En la Figura 32 se observa la cepa MSJJ2 en agar APD, presentó colonias de aspecto seco polvoso, de color blanco. En la Figura 41 j) se observa la vista al microscopio, presenta pseudohifas tabicadas que se fragmentan tempranamente en artrosporas rectangulares o en forma de barril.

Género *Aspergillus*

En las Figuras 30 y 31 se observan la cepa MRYP9 en agar APD, presentó colonias con textura pulverulenta, de color inicial blanco-amarillento en el centro que con el tiempo la zona concéntrica extrema se torna café. En la Figura 41 k) se observa la vista al microscopio, presenta cabeza conidial radial, conidióforos no septados hialinos y de paredes lisas, vesícula globosa, fiálides que crecen sobre las métulas y conidios globosos.

6.3.2. Tasa de crecimiento de los hongos en placa.

Los resultados de la tasa de crecimiento provienen de los promedios de las mediciones de los diámetros respecto a los días de incubación y es expresado mm d⁻¹ (milímetro por día). En la Tabla 2 se observa que la cepa fúngica *Trichoderma asperellum* (MRYP4)

presentó una tasa de crecimiento en placa de 31.42 mm d⁻¹ y *Trichoderma* sp (MRMP1) presentó 24.44 mm d⁻¹, dichas cepas fueron las que presentaron mayores tasas de crecimiento, mientras que la cepa *Penicillium* sp 11 (MRYP8) presentó 1.09 mm d⁻¹ y MRYP7 0.79 mm d⁻¹, ambas cepas presentaron las menores tasas de crecimiento en medio APD (Agar Papa Dextrosa) pH 5.5.

Tabla 2. Tasa de crecimiento de las cepas aisladas, en placa con medio APD pH 5.5 (mm d⁻¹).

CEPA	TASA DE CRECIMIENTO (mm d ⁻¹)
<i>Penicillium</i> sp 9 (MRMP3)	2.64
<i>Trichoderma asperellum</i> (MRYP4)	31.42
<i>Penicillium</i> sp 6 (MSCJ1)	5.26
<i>Penicillium</i> sp 2 (MCJ1)	5.03
<i>Penicillium</i> sp 5 (MRYP2)	3.69
<i>Penicillium</i> sp 7 (MSCJ2)	5.08
<i>Penicillium</i> sp 1 (MRYP1)	6.37
<i>Penicillium</i> sp 3 (MCJ2)	3.06
<i>Trichoderma</i> sp (MRMP1)	24.44
<i>Penicillium</i> sp 4 (MRHP1)	3.83
<i>Geotrichum</i> sp (MRYP3)	5.93
<i>Penicillium</i> sp 8 (MRMP2)	1.54
<i>Acidothrix acidophila</i> (MRYP5)	3.95
<i>Galactomyces candidum</i> (MSJJ2)	5.92
<i>Penicillium</i> sp 10 (MRYP6)	4.67
Cepa MRYP7 (MRYP7)	0.79
<i>Penicillium</i> sp 11 (MRYP8)	1.09
<i>Aspergillus</i> sp (MRYP9)	5.94

6.4. Prueba de tolerancia/resistencia a Cr VI y Cd II

Aquellas cepas que presentaron un crecimiento muy lento y/o dificultoso en caldo de cultivo no se tomaron en cuenta para realizar las siguientes pruebas con metales, dichas cepas fueron: La cepa MRYP7, *Penicillium* sp 11 (MRYP8), *Penicillium* sp 8 (MRMP2) y *Acidothrix acidophila* (MRYP5).

En la Tabla 8 se muestran los códigos de las cepas aisladas de ambientes mineros y su capacidad de resistencia a Cd II en medio de cultivo líquido. Se puede observar que

Trichoderma asperellum (MRYP4) presentó mayor resistencia, siendo la única capaz de crecer en caldo YPG con una concentración de 700 ppm de Cd II, las siguientes cepas que presentaron una mediana resistencia a Cd II fueron *Trichoderma koningiopsis* (MSCJ3), *Trichoderma* sp (MRMP1) y *Penicillium* sp 4 (MRHP1), siendo capaces de crecer hasta 200 ppm de Cd II.

De igual manera en la Tabla 8, se muestra su capacidad de resistencia a Cr VI en medio de cultivo líquido. Se puede observar que *Trichoderma asperellum* (MRYP4) presentó una mayor resistencia, siendo la única capaz de crecer hasta 800 ppm de Cr VI, otras cepas que presentaron alta resistencia fueron *Penicillium* sp 1 (MRYP1), que fue capaz de crecer hasta 600 ppm de Cr VI, *Trichoderma* sp (MRMP1) y *Trichoderma koningiopsis* (MSCJ3) ambas capaces de crecer hasta 400ppm de Cr VI.

En la Figura 6 se muestran los resultados de la tolerancia/resistencia a Cd II y Cr VI en medio líquido, donde se observa que diferentes especies de hongos muestran diferente patrón de resistencia. Pueden ser sensibles, moderadamente tolerantes y tolerantes, pero tienen diferente comportamiento frente a cada tipo de metal. Algunos aislamientos fueron más resistentes a cromo que a cadmio tal como la cepa *Penicillium* sp 1 (MRYP1), ninguna cepa evaluada fue más tolerante a cromo que a cadmio, pero si otros fueron resistentes a ambos metales por igual, tal como la cepa *Penicillium* sp 4 (MRHP1), que fue capaz de crecer hasta 200 ppm tanto de Cd II y Cr VI.

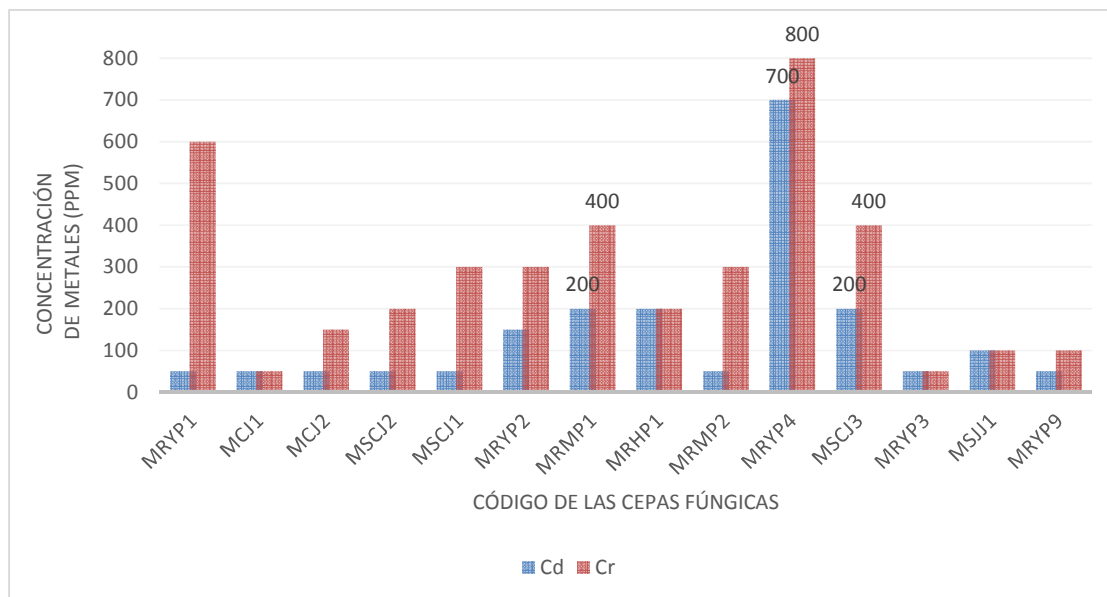


Figura 6. Tolerancia/resistencia de las cepas aisladas a diferentes concentraciones de Cd II y Cr VI, incubadas en caldo YPG, pH 4.5 y agitación a 150 rpm.

Las cepas que presentaron mayor resistencia a ambos metales fueron *Trichoderma asperellum* (**MRYP4**) capaz de crecer a 700 ppm de Cd y 800 ppm de Cr, *Trichoderma* sp (**MRMP1**) capaz de crecer a 200 ppm de Cd y 400 ppm de Cr y *Trichoderma koningiopsis* (**MSCJ3**) capaz de crecer a 200 ppm de Cd y 400 ppm de Cr, razón por la cual dichas cepas fueron seleccionadas para la prueba de CMI, así como se evaluar su comportamiento a diferentes temperaturas y pH.

En todos los casos se observa el crecimiento de la biomasa fúngica en los caldos YPG con metales y sin metales. Se observa un crecimiento mayor de biomasa en el caldo YPG con pH 4.5 sin metal (control negativo).

6.5. Crecimiento en placa de las cepas seleccionadas a diferentes temperaturas

En la Figura 7 se muestra el crecimiento fúngico a diferentes temperaturas de las cepas seleccionadas, realizado en placa Petri con agar YPG, pH 5.5. La cepa *Trichoderma asperellum* (MRYP4) presentó un mayor crecimiento a 30 °C, *Trichoderma* sp (MRMP1) ligeramente mayor a 20 °C y *Trichoderma koningiopsis* (MSCJ3) a 25 °C. Las tres cepas presentaron un crecimiento mayor entre 20 y 25 °C, siendo *Trichoderma asperellum*

(MRYP4), la única capaz de crecer a 30.0 °C, las otras dos cepas se inhiben a dicha temperatura.

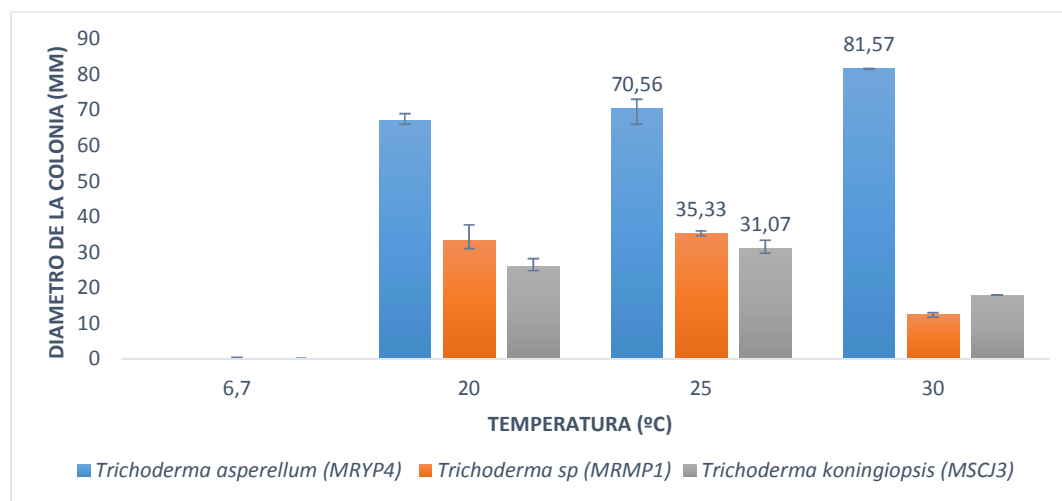


Figura 7. Crecimiento en placa de las cepas *Trichoderma asperellum* (MRYP4), *Trichoderma sp* (MRMP1) y *Trichoderma koningiopsis* (MSCJ3) a diferentes Temperaturas: 6.7, 20, 25 y 30 °C a las 60 horas de incubación.

6.6. Crecimiento en placa de las cepas seleccionadas, a diferentes pH.

En la Figura 8, se muestra el crecimiento fúngico a diferente pH de las cepas seleccionadas, realizado en placa Petri con agar YPG, e incubado a 25 °C. La cepa *Trichoderma asperellum* (MRYP4) presentó un mayor crecimiento a pH 5.0 (Figura 42), *Trichoderma sp* (MRMP1) un similar crecimiento a pH 4.0, 5.0 y 6.0 y *Trichoderma koningiopsis* (MSCJ3) mayor a pH 5.0 (Figura 43). Las tres cepas presentaron un crecimiento similar en pH de 4.0 a 6.0, siendo a pH 5.0 ligeramente mayor.

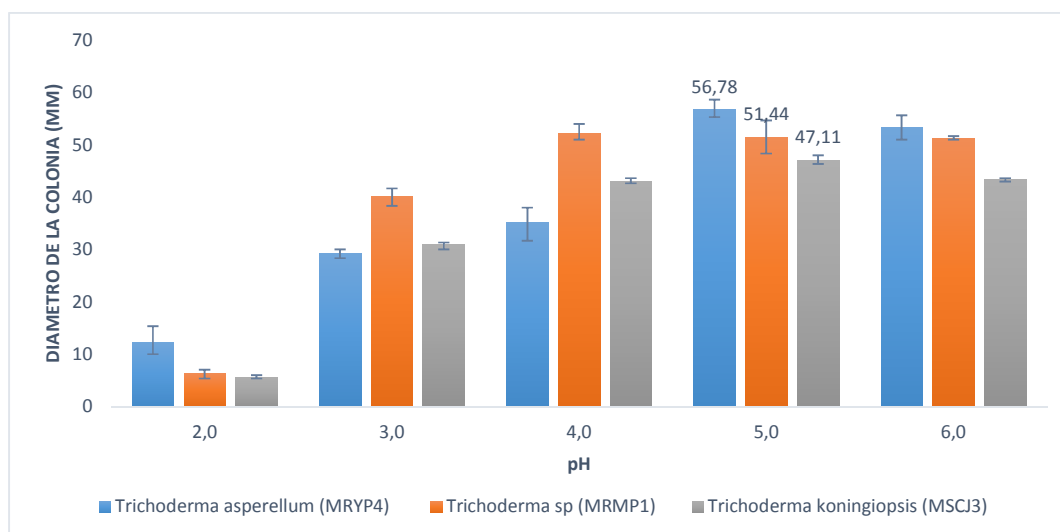


Figura 8. Crecimiento en placa de las cepas *Trichoderma asperellum* (MRYP4), *Trichoderma sp* (MRMP1) y *Trichoderma koningiopsis* (MSCJ3) a diferentes pH: 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 y 6.0 a las 60 horas de incubación.

6.7. Concentración mínima inhibitoria en placa Petri (CMI)

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la concentración más baja del metal que inhibe el crecimiento visible de las cepas seleccionadas.

El crecimiento fúngico en placa Petri sin metales, se observa como crecimientos radiales. En la Tabla 3 se observa que la cepa *Trichoderma asperellum* (MRYP4) presentó una CMI de Cr VI a 1300 ppm (Figuras 47 y 48), presentando un crecimiento más notorio en dicha concentración a partir de las 144 horas (Figura 45 c) y d)) y una CMI de Cd II entre 700 y 900 ppm (Figuras 49 y 50), con un crecimiento micelial radial tenue y compacto (Figura 45 a) y b)). La cepa *Trichoderma sp* (MRMP1) presentó una CMI de Cr VI entre 900 y 1100 ppm (Figura 51), con un crecimiento muy reducido, y una CMI de Cd II entre 700 y 900 ppm (Figura 52), con un crecimiento micelial reducido, irregular y ramificado (Figura 46 a), finalmente la cepa *Trichoderma koningiopsis* (MSCJ3) presentó una CMI de Cr VI entre 1100 y 1300 ppm (Figura 53), con crecimiento micelial muy tenue y un CMI de Cd II entre 700 y 900 ppm (Figura 54), con un crecimiento reducido y compacto (Figura 46 c)).

Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los hongos filamentosos seleccionados.

CEPA FÚNGICAS	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (PPM)	
	Cr VI	Cd II
<i>Trichoderma asperellum</i> (MRYP4)	1100<CMI<1300	700<CMI<900
<i>Trichoderma sp</i> (MRMP1)	900<CMI<1100	700<CMI<900
<i>Trichoderma koningiopsis</i> (MSCJ3)	1100<CMI<1300	700<CMI<900

En la Figura 44 se muestra el Índice de Tolerancia (IT) de las cepas seleccionadas a diferentes concentraciones de metales, el IT consistió en dividir el diámetro del crecimiento fúngico en presencia de metales entre el crecimiento fúngico del control. Se observó que a las 12 horas de incubación el diámetro de crecimiento fúngico en presencia de los metales es mayor al diámetro del crecimiento de la cepa control, representándose en la gráfica como un índice de tolerancia con picos altos ($IT > 1$), pero luego de las 24 horas el IT empieza a descender, hasta establecerse de manera constante, o bien a aumentar o disminuir ligeramente, indicando que las cepas en presencia en metales empiezan a reducir su tasa de crecimiento siendo igual ($IT = 1$), menor o mucho menor ($IT < 1$) que el diámetro de la cepa control.

6.8. Curva de crecimiento de los hongos filamentosos en medio de cultivo líquido

Se realizó la curva de crecimiento de las cepas *Trichoderma asperellum* (MRPY1) y *Trichoderma sp* (MRMP1). Si bien se vino trabajando con la cepa *Trichoderma koningiopsis* (MSCJ3), esta presentó dificultades de crecimiento en medio de cultivo líquido, así como en la evaluación de su cinética de crecimiento, razón por la cual no resultó viable para realizar las pruebas posteriores. En la Figura 9 se observa la curva de crecimiento de *Trichoderma asperellum* (MRPY1), quien presentó una etapa exponencial entre las 12 y 60 horas, siendo más lineal a partir de las 24 horas, llegando a registrar mayor biomasa a las 144 horas, luego de las 168 horas empieza un leve

descenso para luego subir ligeramente a las 216 horas, no encontrándose una etapa de muerte propiamente dicha.

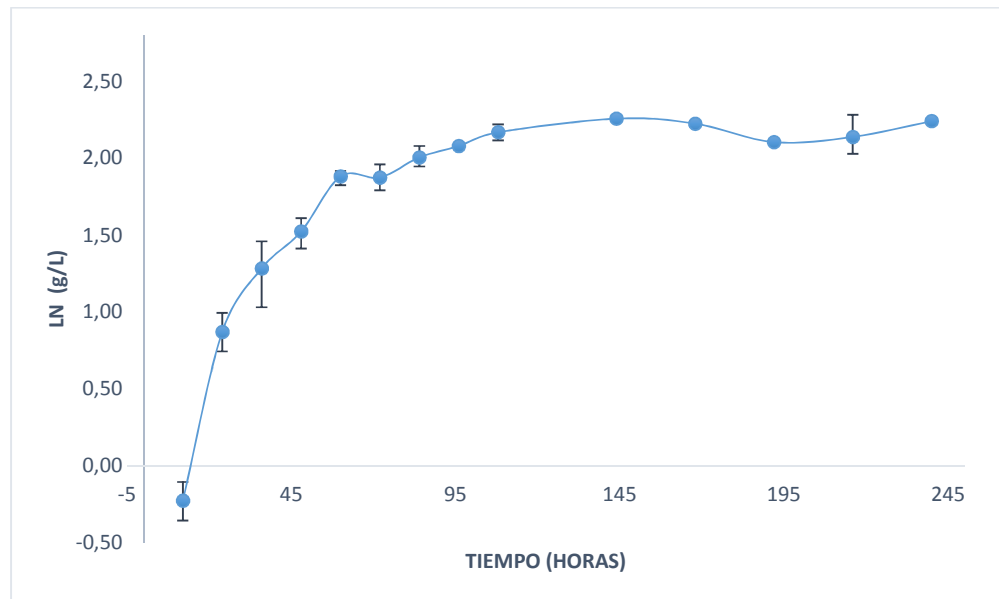


Figura 9. Curva de crecimiento de la cepa *Trichoderma asperellum* (MRPY4) en caldo Czapek modificado, incubado a 150 rpm, pH 5.0 y 25 °C.

En la Figura 10 se observa la curva de crecimiento de *Trichoderma sp* (MRMP1), presenta una etapa exponencial entre las 24 y 108 horas. Presenta un retardado inicio en el aumento de su biomasa, donde a las 24 horas sigue en etapa de adaptación, posterior a ello presenta un aumento rápido de biomasa hasta las 48 horas, para volver a disminuir levemente, luego nuevamente presenta una etapa exponencial, más lineal, entre las 72 y 108 horas aparentando dos etapas exponenciales, y aumentando levemente su biomasa después de las 108 h, registrando inclusive un aumento progresivo de su biomasa más allá de las 240 horas, superior al tiempo de evaluación considerado para la presente tesis, por lo cual no se observa una etapa de muerte.

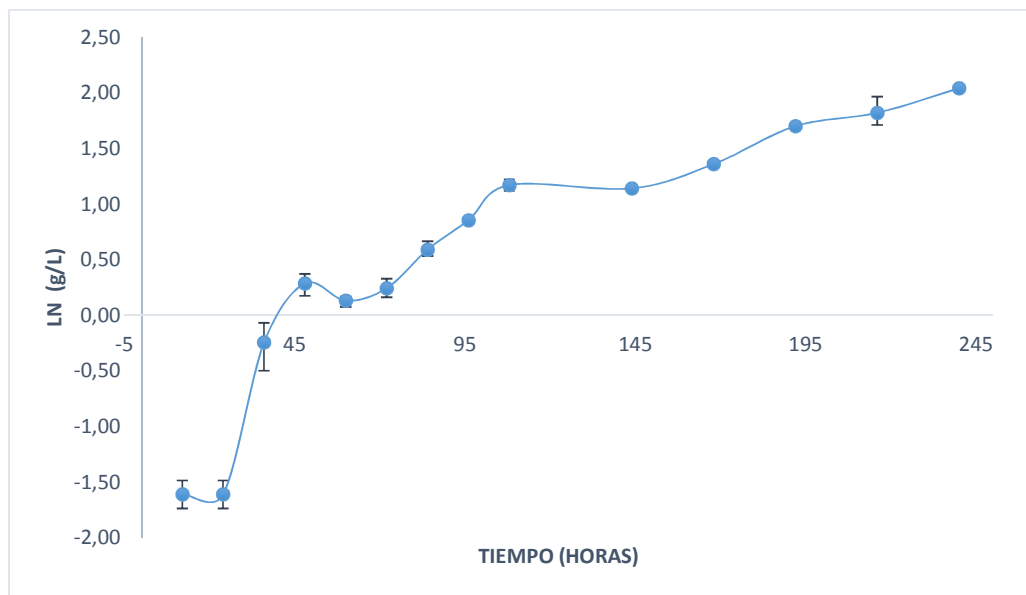


Figura 10. Curva de crecimiento de la cepa *Trichoderma sp* (MRMP1) en caldo Czapek modificado, incubado a 150 rpm, pH 5.0 y 25 °C.

6.8.1. Tasa de crecimiento en medio de cultivo líquido

Las tasas de crecimiento (μ_x), se determinaron para cada cepa a partir de una regresión lineal de la curva de crecimiento usando la siguiente fórmula:

$$\mu_x = \frac{\text{Ln}X_f - \text{Ln}X_o}{T_f - T_o}$$

Dónde:

Xo: Población inicial; Xf: Población final; To: Tiempo inicial; Tf: Tiempo final.

Los resultados de los cálculos para cada una de las cepas de hongos filamentosos estudiados se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Tasa de crecimiento μ_x (h^{-1}) de las cepas en medio líquido

CEPA	Tasa de Crecimiento μ_x (h^{-1})
<i>Trichoderma asperellum</i> (MRPY4)	0.0406
<i>Trichoderma sp</i> (MRMP1)	0.0335

En la Figura 11 se observa la linealización de la fase logarítmica las cepas estudiadas, donde la tasa de crecimiento de *Trichoderma asperellum* (MRPY1) es 0.0406 h^{-1} , siendo mayor que la presentada por *Trichoderma sp* (MRMP1) 0.0335 h^{-1} .

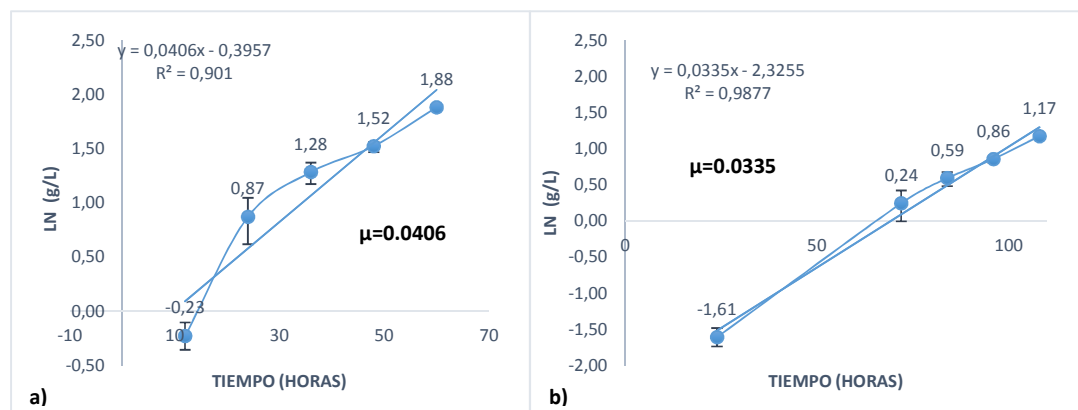


Figura 11. Linearización de la fase logarítmica de las cepas fúngicas: a) *Trichoderma asperellum* (MRPY4) con una tasa de 0.0406 h^{-1} y b) *Trichoderma sp* (MRMP1) con una tasa de 0.0335 h^{-1} .

6.9. Biosorción de Cr VI y Cd II por las cepas MRYP4 y MRMP1 en medio de cultivo líquido

De la Figura 12 a la 14 se observó que *Trichoderma asperellum* (MRYP4) presentó diferentes tasas de crecimiento (0.0232 , 0.0203 y 0.0116 h^{-1}) a 57, 22.8 y 12.5 ppm de Cr VI respectivamente, observándose que, a menor concentración, disminuye la tasa. De la Figura 15 a la 17 se observó que la misma cepa presentó sendas tasas de crecimiento (0.0099 , 0.0252 y 0.0204 h^{-1}) a 36, 23.3 y 10.7 ppm de Cd II respectivamente, pero en este caso presentó menor tasa en la concentración más elevada. Y la cepa *Trichoderma sp* (MRMP1) presentó una tasa de 0.0119 h^{-1} a 30.6 ppm de Cr VI (Figura 18), y 0.0230 h^{-1} a 21 ppm de Cd II (Figura 19). Todas las tasas observadas presentaron valores inferiores a las obtenidas en la linealización de la curva de crecimiento sin metales.

6.9.1. Curva de crecimiento en medio de cultivo líquido con metales

Se utilizó la misma fórmula para hallar la tasa de crecimiento en medio líquido sin metal.

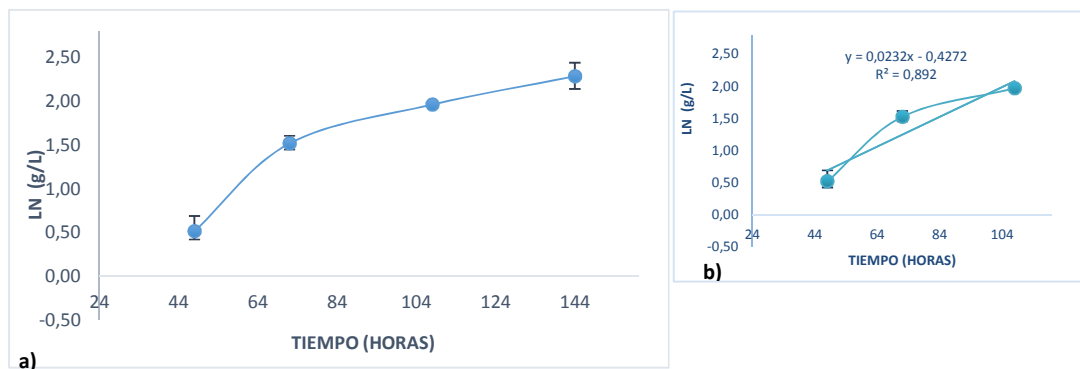


Figura 12. Representación de: a) Curva de crecimiento de *Trichoderma asperellum* (MRPY4) en caldo Czapek con 57 ppm de Cr VI. b) Linealización de la fase exponencial, con una tasa de crecimiento de 0.0232 h^{-1} .

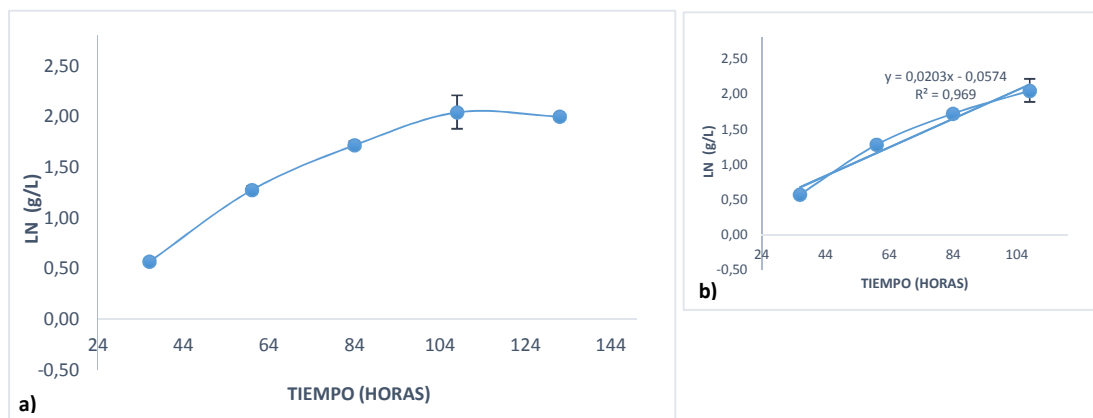


Figura 13. Representación de: a) Curva de crecimiento de *Trichoderma asperellum* (MRPY4) en caldo Czapek con 22.8 ppm de Cr VI. b) Linealización de la fase exponencial, con una tasa de crecimiento de 0.0203 h^{-1} .

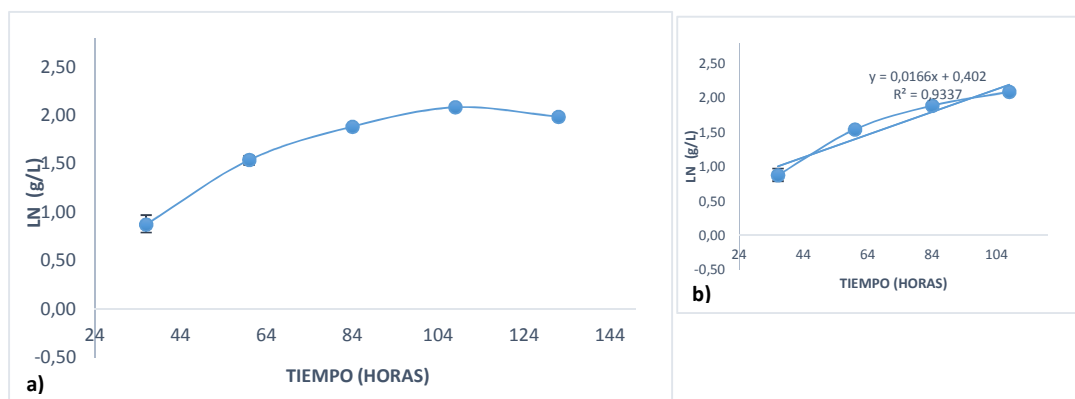


Figura 14. Representación de: a) Curva de crecimiento de *Trichoderma asperellum* (MRPY4) en caldo Czapek con 12.5 ppm de Cr VI. b) Linealización de la fase exponencial, con una tasa de crecimiento de 0.0166 h^{-1} .

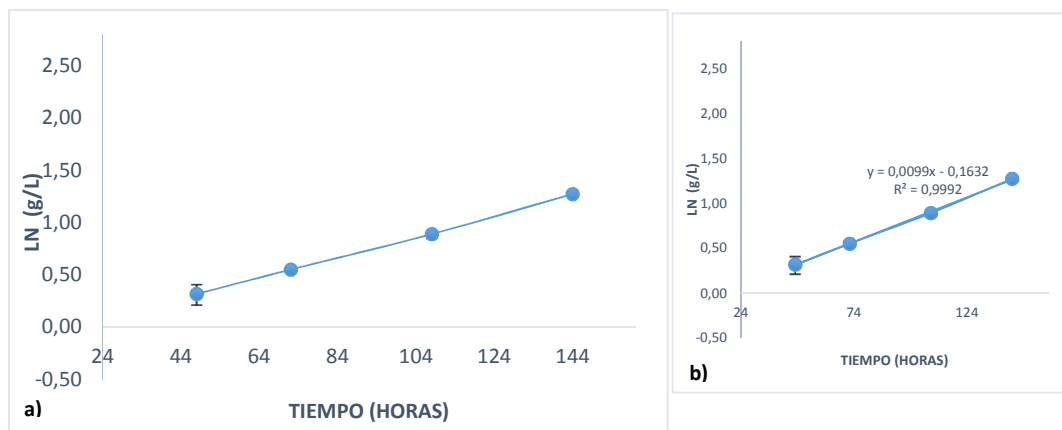


Figura 15. Representación de: a) Curva de crecimiento de *Trichoderma asperellum* (MRPY4) en caldo Czapek con 36 ppm de Cd II. b) Linealización de la fase exponencial, con una tasa de crecimiento 0.0099 h^{-1} .

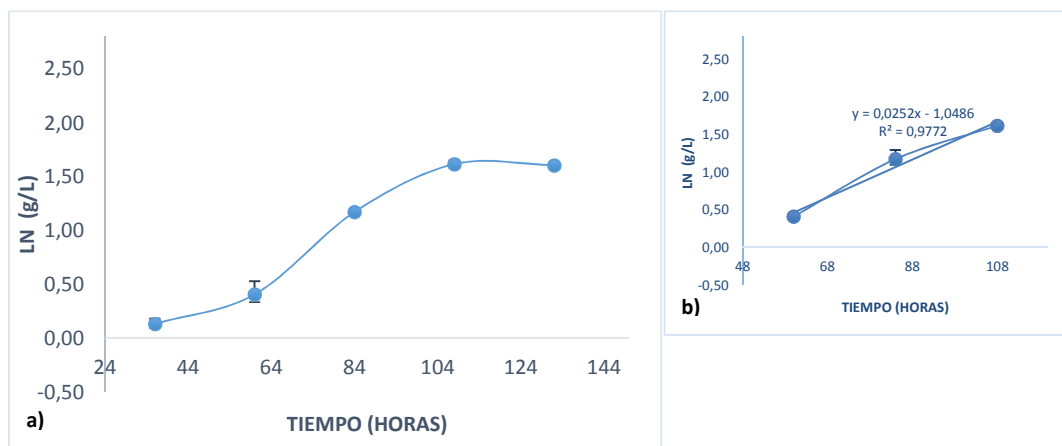


Figura 16. Representación de: a) Curva de crecimiento de *Trichoderma asperellum* (MRPY4) en caldo Czapek con 23.3 ppm de Cd II. b) Linealización de la fase exponencial, con una tasa de crecimiento 0.0252 h^{-1} .

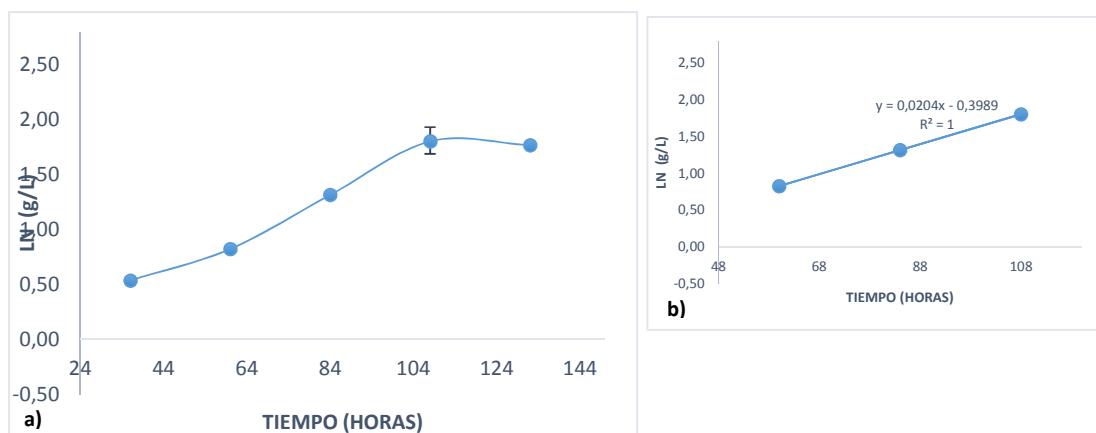


Figura 17. Representación de: a) Curva de crecimiento de *Trichoderma asperellum* (MRPY4) en caldo Czapek con 10.7 ppm de Cd II. b) Linealización de la fase exponencial, con una tasa de crecimiento 0.0204 h^{-1} .

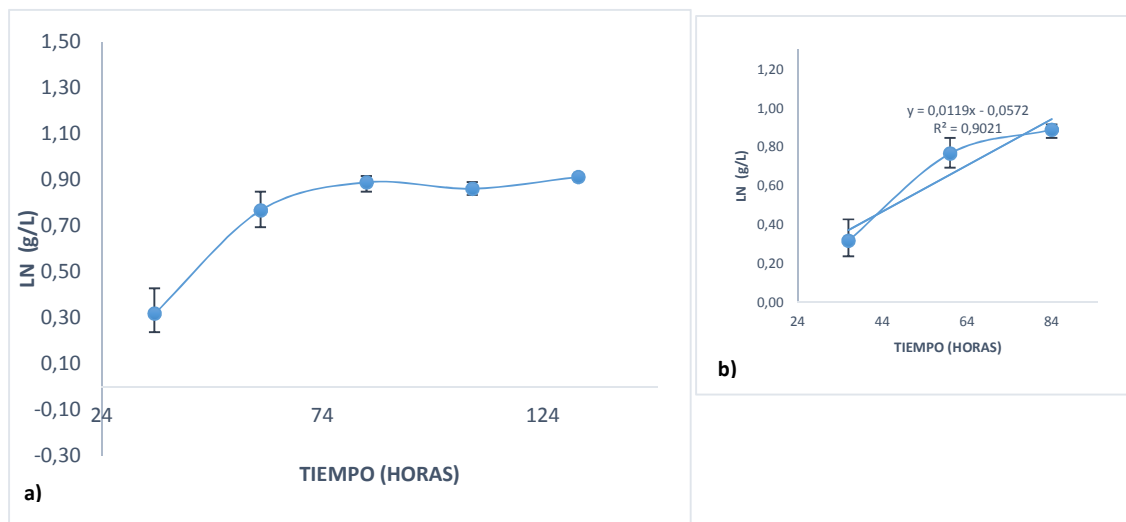


Figura 18. Representación de: a) Curva de crecimiento de *Trichoderma* sp (MRMP1) en caldo Czapek con 30.6 ppm de Cr VI. b) Linealización de la fase exponencial, con una tasa de crecimiento 0.0119 h^{-1} .

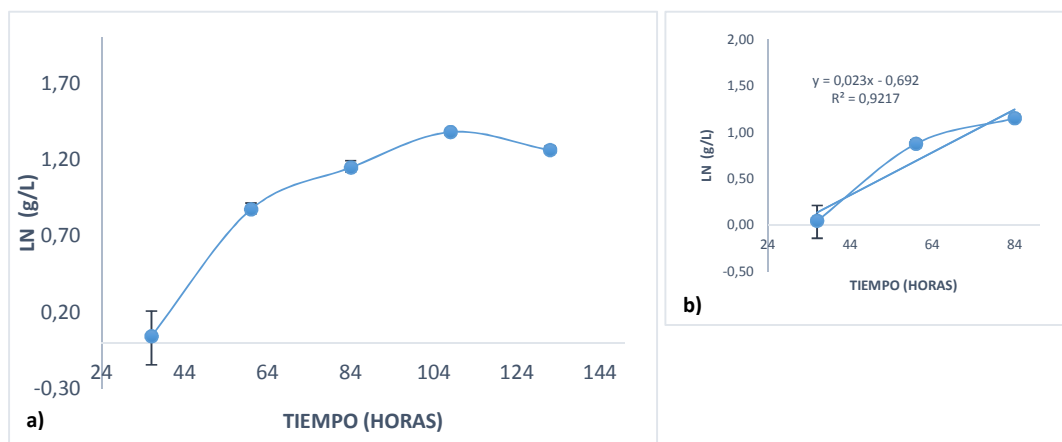


Figura 19. Representación de: a) Curva de crecimiento de *Trichoderma* sp (MRMP1) en caldo Czapek con 21 ppm de Cd II. b) Linealización de la fase exponencial, con una tasa de crecimiento 0.023 h^{-1} .

En las Figuras 20 y 21 se observa que *Trichoderma asperellum* (MRYP4), presentó un mayor porcentaje de biosorción (20%) a 22.8 ppm de Cr VI, y un 73% a 23.3 ppm de Cd II. Y e las Figuras 22 y 23 se observa que *Trichoderma* sp (MRMP1), presentó un porcentaje de biosorción (47%) a 30.6 ppm de Cr VI y un 36% a 21 ppm. Dichos resultados indican que *Trichoderma asperellum* (MRYP4) biosorbe mejor el Cd II y por otro lado *Trichoderma* sp (MRMP1) el Cr VI.

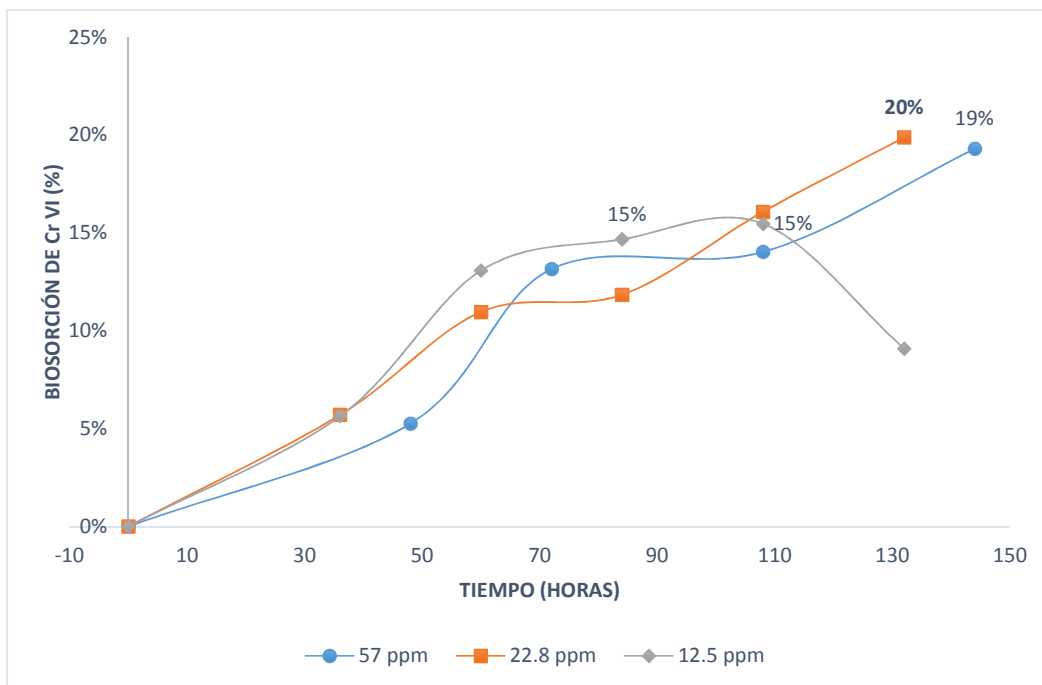


Figura 20. Porcentaje de biosorción (%) de la cepa *Trichoderma asperellum* (MRYP4) en caldo Czapek con 57, 22.8 y 12.5 ppm de Cr VI, incubado a 150 rpm, pH 5.0 y 25 °C.

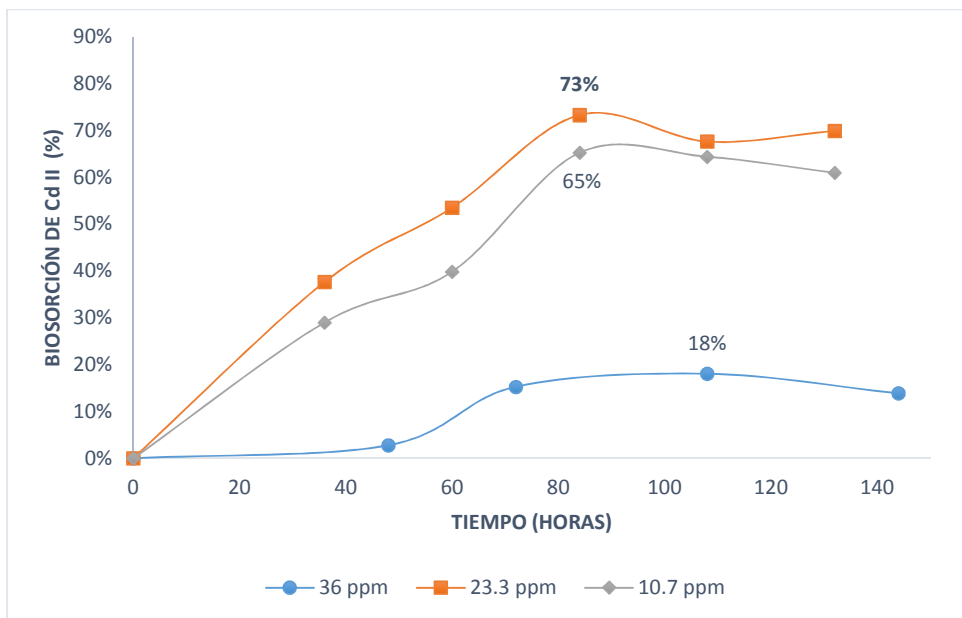


Figura 21. Porcentaje de biosorción de la cepa *Trichoderma asperellum* (MRYP4) en caldo Czapek, con 36, 23.3 y 10.7 ppm de Cd II incubado a 150 rpm, pH 5.0 y 25 °C.

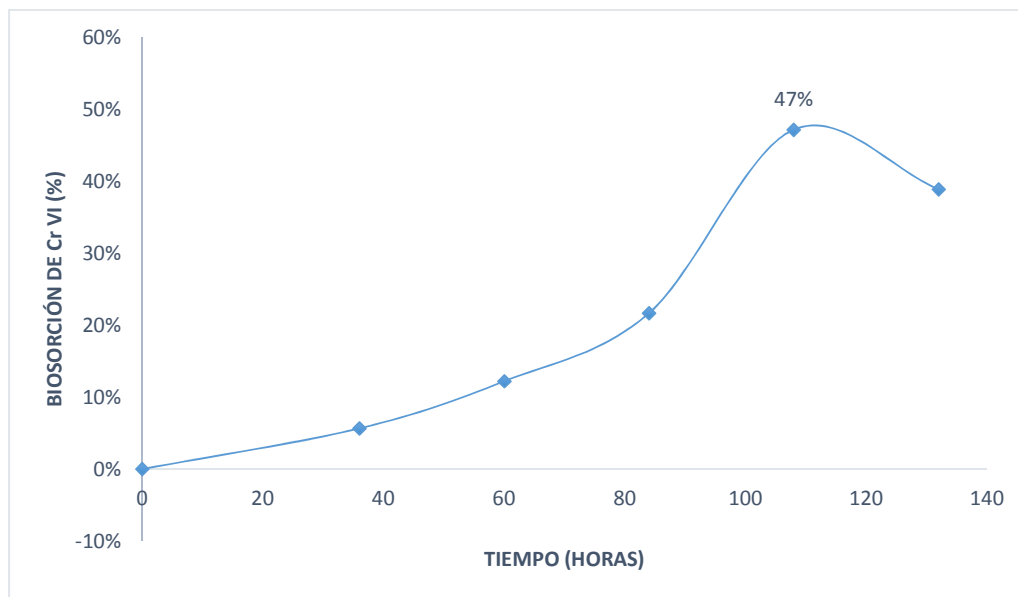


Figura 22. Porcentaje de biosorción de la cepa *Trichoderma* sp (MRMP1) en caldo Czapek con 30.6 ppm de Cr VI, incubado a 150 rpm, pH 5.0 y 25 °C.

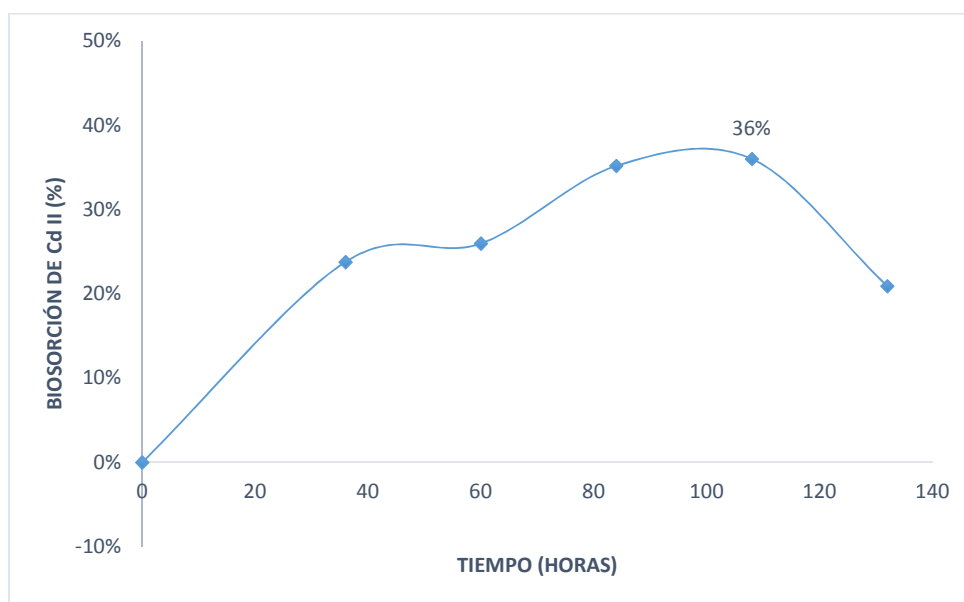


Figura 23. Porcentaje de biosorción de la cepa *Trichoderma* sp (MRMP1) en caldo Czapek con 21 ppm de Cd II, incubado a 150 rpm, pH 5.0 y 25 °C.

6.10. Biosorción de Cd II por biomasa viva en solución acuosa

La capacidad de biosorción es representa por Q. En la Tabla 5 se observa que la mayor biosorción de Cd II (1.8 mg/g) por *Trichoderma asperellum* (MRYP4) se dio a una concentración inicial de 40.4 ppm de dicho metal.

Tabla 5. Biosorción (Q) de Cd II por biomasa viva de *Trichoderma* sp (MRMP1) en solución acuosa.

Ci Cd II (mg/L)	TIEMPO (horas)	Cf: Q (mg metal/g biomasa)			Promedio Q (mg/g)	SD
		QA	QB	QC		
10.3	1	0.14	0.13	0.13	0.13	0.009
10.3	3	0.34	0.34	0.26	0.32	0.045
10.3	5	0.36	0.38	0.28	0.34	0.054
20.5	1	0.51	0.18	0.34	0.34	0.168
20.5	3	0.87	0.67	0.78	0.77	0.102
20.5	5	0.24	0.57	0.39	0.40	0.165
40.4	1	0.64	0.60	0.62	0.62	0.017
40.4	3	1.12	0.74	0.90	0.92	0.195
40.4	5	1.22	1.13	1.20	1.18	0.046

Para realizar la gráfica representada en la Figura 24, se procesó los datos de la Tabla 5 mediante un diseño experimental de Superficie de Respuesta y luego una gráfica de contorno en MINITAB 17.1.0, donde las zonas con mayor intensidad representan los mayores valores de biosorción (Q), y las zonas más claras los menores valores, en relación con la concentración de Cd II (mg/L) y el Tiempo (horas).

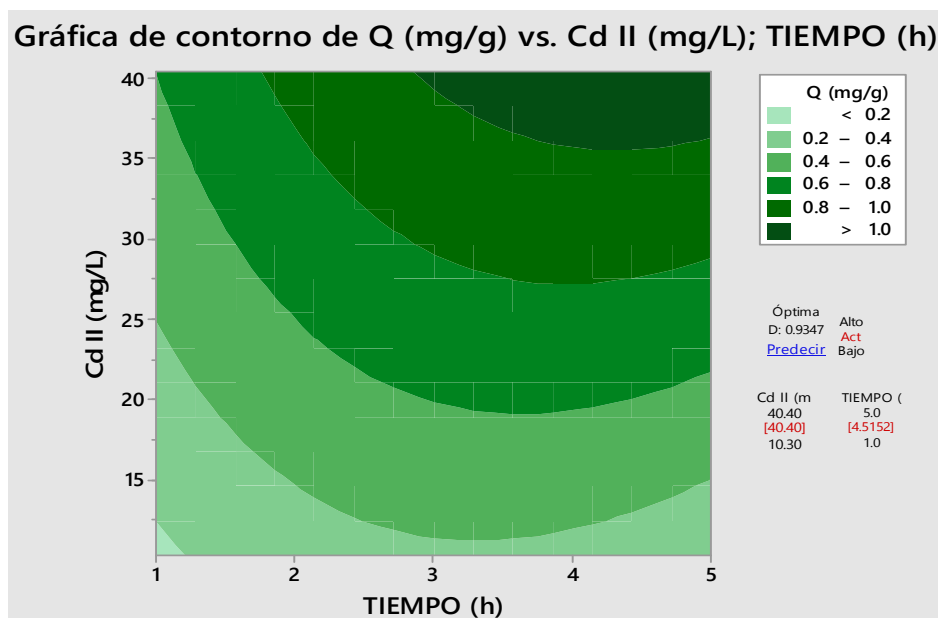


Figura 24. Gráfica de contorno de Biosorción (Q) (mg/g) vs. Cd II (mg/L); Tiempo (h).

7. DISCUSIÓN

7.1. Crecimiento de los hongos en diferentes pH y temperatura

La mayoría de las cepas aisladas presentaron crecimiento lento en el rango de temperatura de los mesófilos, esto se debe a que los microorganismos fueron aislados de zonas, con condiciones extremas, altas concentraciones de metales pesados, bajas temperaturas cercanas a los 10 °C, con metabolismo más lento, según los reportes realizados por (Gerday *et al.*, 2000). La tasa de crecimiento de cada cepa se usó también como criterio de selección, algunas de las cepas fueron descartadas por su lento crecimiento en estas condiciones, y en algunos casos su dificultosa reproducción en medios comerciales de laboratorio, muchos de los microorganismos ambientales no pueden ser cultivables en laboratorio, debido que dichas condiciones no se pueden simular, mucho más difícil cuando son obtenidos de ambientes extremos.

Los microorganismos que habitan en medio ambiente ácidos son conocidos como “acidófilos”, aquellos que crecen a $\text{pH} < 3.0$ son considerados acidófilos extremos, y los que muestran un crecimiento óptimo en un rango de pH 3-5 son considerados acidófilos moderados (Gerday 2000). En nuestro caso las cepas en su mayoría fueron aisladas de ambientes fríos cercanos a 10 °C y pH menores a 5, incluso menores a pH 2, como el caso de la relavera Yanamate.

En el aislamiento fúngico se observó que en los medios de cultivo el crecimiento de levaduras era mayor que los hongos filamentosos, según Tuttle *et al.*, (1968) las levaduras se encuentran en mayor proporción que las bacterias en aguas ácidas, pero requieren de nutrientes carbonados los cuales se podrían adicionar al medio de cultivo. En el presente estudio se aislaron mayormente cepas del género *Penicillium* (Figura 5).

7.2. Resistencia y tolerancia de los hongos filamentosos a metales pesados

La variación en la tolerancia de los metales puede ser debido a la presencia de uno o más tipos de estrategia de tolerancia o mecanismos de resistencia exhibido por los hongos (Tabla 8).

Los resultados de Índice de tolerancia (IT) obtenidos en el presente trabajo cumplen los patrones de crecimiento reportados por Anahid *et al.*, (2011) donde menciona que el patrón de crecimiento de los hongos en presencia de metales está caracterizado por cinco etapas, donde se puede apreciar el efecto tóxico de los metales pesados en el crecimiento de los hongos. La fase b, correspondiente a la fase de crecimiento rápido donde se inicia el crecimiento inicial del hongo, se observa notoriamente en el presente trabajo, a concentraciones entre 25 y 50 ppm para ambos metales (Cd II y Cr VI), donde presentaron un IT mayores a 1, que indica que los diámetros de las cepas evaluadas a dichas concentraciones de metal fueron mayores al de los controles sin metal, en la fase tardía se observa IT menores a 1, lo que indica que la presencia de metal retarda el crecimiento de las cepas evaluadas, el IT varía con el tiempo de exposición a los metales pesados y el tipo de cepa. En los estudios realizados por Anahid, (2011) reportaron resultados similares con Zn, con una cepa de *Penicillium simplicissimu*, la mayor tolerancia obtenida con el Zn fue de (8000 ppm), los autores no realizaron pruebas con metales mucho más tóxicos como Cd y Cr.

Ezzouhri *et al.*, 2009, reportó ensayos de tolerancia donde la cepa más tolerante pertenecía al género *Fusarium* sp con una CMI de 25 mM (1300 ppm) a Cr VI. Por otro lado, *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp eran también muy tolerantes a Cr VI hasta 10mM (520 ppm) y 15 mM (780 ppm), respectivamente. En la presente tesis la cepa más tolerante a Cr VI fue *Trichoderma asperellum* (MRYP4) que presentó una CMI de 1300 ppm similar a lo obtenido por *Fusarium* sp, seguido de *Trichoderma koningiopsis* (MSCJ3) con un CMI 1100 ppm a dicho metal. Los resultados obtenidos respecto a la

tolerancia, se determinó que el metal Cd II fue más tóxico que el Cr VI, donde las cepas crecieron solo hasta 700 ppm de Cd II.

Bader (1999) encontró que la *Monilia sp* y *Penicillium sp* mostraron una alta resistencia a Cr hasta 10 mM (520 ppm), dichos resultados son inferiores a los obtenidos por nuestras tres cepas del género *Trichoderma* (MRYP4, MRMP1 y MSCJ3) evaluados en la presente tesis.

La morfología de las cepas se vio afectada por la presencia de Cr y Cd. Sus micelios crecieron de manera irregular y difusa en comparación con el control, la tasa de crecimiento fue diferente, siendo más lenta que el control en los tiempos prolongados, además se vio alterada su conidiogénesis, en el caso de las cepas expuestas a Cr, la conidiogénesis se observó en una etapa más temprana (entre 3 y 4 días) y con mayor abundancia respecto al control y por otro lado frente al cadmio se notó en una etapa más tardía hizo (10 a 14 días) e incluso en algunos casos no se observaba la característica, pigmentación verde de las colonias sin exposición al metal.

7.3. Biosorción de metales por cepa viva en medio líquido

Para el presente estudio de biosorción los mejores resultados se obtuvieron a una concentración alrededor de los 20 a 30 ppm, tanto para la biosorción de Cr VI y Cd II, pero en realidad depende mucho del comportamiento de los microorganismos frente a determinado metal. La cepa *Trichoderma asperellum* (MRYP4) presentó un porcentaje de biosorción máximo (73%) a las 84 horas de la cinética de crecimiento. Ello coincide en parte, lo sustentado por Chatterje (2006) quien realizó la biosorción de Cd II utilizando biomasa viva y muerta de hongos filamentosos *Paecilomyces variotii* (45% a 20 ppm) y *Cladosporium resinae* (46% a 10 ppm), donde llegó a la conclusión que la cepa viva de dichos hongos tenían un máximo de biosorción entre 10 y 20 ppm después de 96 horas.

Los reportes sobre hongos con capacidad de reducir el Cr (VI) son escasos; dichos organismos incluyen levaduras como *Candida utilis* (Muter *et al.*, 2001), *Candida*

maltosa (Ramírez-Ramírez *et al.*, 2004) y hongos filamentosos como *Aspergillus sp* y *Penicillium sp* (Espino - Saldaña, 2002). Se han descrito cepas de hongos filamentosos con excelentes capacidades para la remoción de cromo (Park *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2006; Srivastava y Thakur, 2006). Por otro lado, Acosta y col., (2005), reportan un estudio de bioadsorción de Cr^{+6} en solución acuosa 0.2 ppm (0.004 mM) por biomasa muerta con *Cryptococcus neoformans* y *Helminthosporium sp*. La biomasa de *C. neoformans* fue más eficiente en la remoción de Cr^{+6} (98%) que *Helminthosporium sp* (65%). Los porcentajes fueron calculados en los sobrenadantes, condiciones similares a las empleadas por nosotros. El presente estudio de biosorción de metales con hongos filamentosos, es inédito en nuestro país, nuestros trabajos son preliminares, cuyos resultados ayudaran a vislumbrar y ser una alternativa en procesos de biorremediación de aguas contaminadas con metales pesados

7.4. Biosorción de metales por biomasa viva en solución acuosa

Los trabajos realizados con biomasa viva en soluciones acuosas son escasos (Zafar *et al.*, 2007), y es uno de los pocos realizado en el Perú.

Zafar y col., (2007) realizaron ensayos con las cepas de *Aspergillus sp* y *Rhizopus sp* para determinar el potencial de biosorción para Cr^{+6} y Cd^{+2} in vitro. Realizaron pruebas con biomasa viva de dichos hongos filamentosos en soluciones con metales. Hallaron que la biosorción máxima de los iones de Cr^{+6} y Cd^{+2} sucedió a una concentración inicial de 6 mM. Donde *Aspergillus sp*1 presentó una biosorción de 1,20 mg de Cr y 2,72 mg de Cd por gramo de biomasa seca y *Rhizopus sp*, una biosorción de 4.33 mg del ion Cr^{+6} y 2.72 mg del ion Cd^{+2} por gramo de biomasa seca. Estos autores además acotan que la acumulación de estos dos metales por *Aspergillus sp*.2 (cepa muy tolerante) estuvo a la par con la una cepa relativamente menos tolerante de *Aspergillus sp*.1. Zafar y col., (2007) también reportan que existe poca correlación entre tolerancia y/o resistencia de un metal y la biosorción. En la presente tesis la biomasa viva de la cepa

Trichoderma asperellum (MRYP4) presentó un máximo valor de biosorción para Cd^{+2} a una concentración inicial de 40.4 ppm, donde el valor fue de una biosorción de 1.18 mg del ion Cd^{+2} por gramo de biomasa, valor superior al obtenido por la cepa *Aspergillus sp1*.

En la presente tesis se utilizó biomasa viva de hongos filamentosos durante una cinética de biosorción, el inóculo se obtuvo a partir de un cultivo de esporas, el porcentaje de biosorción se determinó a partir del metal remanente en el sobrenadante.

Bankar y col. (2009) realizaron un estudio de biosorción en una solución de 50 ppm de Cr^{+6} , con biomasa de *Yarrowia lipolytica*, en condiciones de pH 1.0, 35 °C y 130 rpm de agitación. La eficiencia máxima de biosorción fue de 95.84 % alrededor de las 2 hrs de exposición al metal, con biomasa viva. En la presente tesis la cepa *Trichoderma sp* (MRMP1) presentó un 47% de biosorción de Cr VI a 30.6 ppm a las 108 horas, inferior a lo reportado por Bankar.

Filipovic-Kovacevic *et al.*, (2000) realizó un trabajo acerca de la biosorción de cromo, cobre, nickel y Zinc con pellets de *Aspergillus niger* en soluciones acuosas, donde obtuvo un resultado de biosorción de Cr VI (2.99 mg de Cr VI /g de biomasa seca), en la presente tesis no se realizó biosorción de Cr VI en solución acuosa debido a que los porcentajes de biosorción (47%) obtenidos previamente fueron inferiores a los obtenidos con Cd II (73%) en los ensayos en medio de cultivo líquido, así que la biosorción en solución acuosa solo se realizó para Cd II, donde se obtuvo un valor de biosorción de 1.18 mg de Cd II por g de biomasa seca.

Kapoor y Viraraghavan (1998), obtuvieron un valor de biosorción de Cd II (1.35 mg/g) de biomasa viva de *Aspergillus niger* en un tiempo de contacto de 12 h, un valor muy cercano se obtuvo en la presente tesis (1.18 mg/g) en la biosorción de Cd II por la biomasa viva de *Trichoderma asperellum* (MRYP4) en un tiempo de contacto de 5 h.

Según los resultados obtenidos de biosorción con *Trichoderma asperellum* (MRYP4), es probable que a mayor tiempo de contacto aumenten los valores de biosorción de Cd II.

Yan y Viraraghavan (2000) reportaron valores altos en la biosorción de Cd (6.94 mg/g) por biomasa viva de *Mucor rouxii* en una concentración inicial de 10 ppm de dicho metal y con un tiempo de contacto de 15h, siendo valores muy superiores respecto a los valores descritos por otros autores, y también a los valores de biosorción obtenidos en la presente tesis (1.18 mg/g) para Cd II por biomasa viva de *Trichoderma asperellum* (MRYP4), pero nuestro experimento fue a mayor concentración de Cd II (40.4 ppm) y con menor tiempo de contacto de 5 h. Los autores adicionalmente realizaron un pretratamiento a la biomasa de *Mucor rouxii* con detergente C₂H₆SO (10.07 mg/g), donde el crecimiento del micelio de *Mucor rouxii* crece de manera suspendida, así como *Trichoderma asperellum* (MRYP4) y esto favorecería en comparación con crecimientos fúngicos en forma de pellets los cuales tienen una menor área de superficie, a su vez, de acuerdo a los resultados de biosorción en solución acuosa obtenidos en la presente tesis es posible que aumentando los tiempos de contacto y menor concentración del metal en la solución, se podría aumentar los valores de biosorción de Cd II.

7.5. Comportamiento de la biosorción de metales pesados

Existe una diferencia entre la biosorción de Cr⁺⁶ y Cd⁺² en medio líquido, según Wang y Chen (2006), las cepas de hongos filamentosos pueden ser selectivas a determinados metales y es por ello la respuesta es diferente. En la presente tesis, en los ensayos de biosorción de Cr VI se observa que *Trichoderma asperellum* (MRYP4) presentó mucho menor porcentaje de biosorción que *Trichoderma* sp (MRMP1), siendo ambas cepas del mismo género, la relación para la capacidad de biosorción de determinado metal es propia de cada cepa.

En la compartimentalización, la reducción de la concentración de metales pesados tóxicos en el citoplasma se puede dar de dos maneras: mediante el eflujo de iones y el

transporte al interior de la vacuola. Siendo el segundo caso con mayor garantía de resolver el problema de toxicidad (Navarro-Aviño *et al.*, 2007). Los hongos en lugares contaminados pueden crecer en presencia de metales pesados debido a su adaptación fisiológica y estar asociada con el incremento de la capacidad de absorción de metales pesados (Iram *et al.*, 2012).

En el presente trabajo no se llegó a saber el mecanismo exacto de por la cual las biomásas vivas disminuyeron el metal en el medio donde se encontraban. La biosorción de metales, está mayormente basado en la asociación iónica con la superficie celular o extracelular como polisacáridos, proteínas y quitina (Volesky, 1990). Según Sarret *et al.*, (1998) los sitios de unión en la pared de los metales Zn y Pb se encontraban en las paredes de *Penicillium chrysogenum*, donde muestra una unión predominante a grupos fosforilo y carboxilo.

Trichoderma asperellum (MRYP4) presentó máximos valores de tolerancia, de 800 ppm para Cr VI y > 700 ppm de Cd II. *Trichoderma sp* cepa (MRMP1) tolero hasta 400 ppm de Cr VI, y de Cd II > 200 ppm. Mientras que en las pruebas de biosorción, *Trichoderma asperellum* (MRYP4) presentó un mayor porcentaje de biosorción (73%) a 23.3 ppm de Cd II y porcentajes menores (20%) para 22.8 ppm de Cr VI, siendo altamente tolerante a dicho metal., Por otro lado, *Trichoderma sp* (MRMP1) presentó el mayor porcentaje de biosorción (47%) a 30.6 ppm de Cr VI, siendo menos tolerante a Cr VI, que la cepa MRYP4 y regular porcentaje de biosorción (36%) a 21 ppm de Cd II. Estos resultados no indican claramente una correlación entre a una mayor tolerancia un mayor porcentaje de biosorción. Otros autores habían encontrado una conclusión similar, como Zafar *et al.*, (2007) donde precisan que existe poca o ninguna correlación entre la tolerancia de los metales y las propiedades de biosorción de los hongos filamentosos.

7.6. Caracterización e Identificación de los hongos filamentosos

La identificación molecular de las cepas aisladas se realizó mediante la amplificación de la región ITS 1 e ITS2 del gen ARN ribosomal, esto permitió realizar la identificación a nivel de género de los hongos filamentosos aislados (*Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Acidothrix*, *Galactomyces* y *Aspergillus*), los cuales fueron complementados con las observaciones macro y microscópicas como lo sugieren varios autores (Colwell, 1970 Valverde, 2003; González, 2014). La región ITS ha sido empleada por la mayoría de autores (Siddiquee, 2017; González, 2014; Hermosa, 2000) para la identificación molecular de los hongos filamentosos, pero González (2014) menciona que es necesario analizar más de un gen para lograr una correcta identificación e identificar a nivel de especie.

Según González (2014), otra de las regiones usadas fue la región D1/D2 del gen del ARNr 26S, en la presente tesis se logró la identificación de las cepas MCJ1 y MRYP2 correspondientes al género *Penicillium*, dicha región es comúnmente utilizada para la identificación de levaduras hasta especie debido a que presenta un 1% de divergencia, pero también existen levaduras que no pueden ser capaces de identificar hasta especie y para ello sugiere complementar dichos resultados con algunas pruebas bioquímicas en caso de ser necesario.

Los resultados hallados muestran el potencial que tienen los hongos filamentosos en el campo de la biorremediación, que podría ser reforzado con el empleo de otros organismos, como vegetales y de la biotecnología.

8. CONCLUSIONES

- Nuestros resultados con las cepas de hongos filamentosos seleccionados del género *Trichoderma*, presentaron buena tolerancia y/o resistencia a estos metales pesados, no estableciéndose una relación directa entre tolerancia y su capacidad de biosorción, dicha característica parece ser independiente de cada cepa.
- La cepa *Trichoderma* sp (MRYP4), presentó un porcentaje de biosorción máximo (75%) a las 82 horas durante la cinética de biosorción con Cd^{+2} (23.3 ppm), siendo un resultado interesante ya que dicho metal resultó ser más tóxico que el Cr en la prueba de tolerancia.
- La cepa *Trichoderma asperellum* (MRMP1), presentó una biosorción de 1.18 mg de Cd^{+2} por cada gramo de biomasa seca a 40.4 ppm y en 5 h.
- Los resultados de biosorción de Cd II y Cr VI obtenidos en el presente estudio, los hongos filamentosos aislados de ambientes acuáticos Altoandinos podrían ser utilizados en un programa de biorremediación donde se plantee la recuperación de aguas contaminadas.

9. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios experimentales de biosorción *in situ* para determinar la viabilidad y la aplicabilidad de los mohos como posibles microorganismos a ser empleados en procesos de biorremediación de aguas contaminadas con metales pesados.
- Realizar pruebas de tolerancia en caldo de cultivos, obteniendo los pesos secos de los controles y las pruebas con metales, para de esa manera tener un sustento estadístico.
- Realizar un diseño experimental donde se evalué los parámetros, Concentración inicial, pH y tiempo de contacto a Cd^{+2} de la cepa *Trichoderma asperellum* (MRMP1), ya que dicha cepa presentó buenos resultados de biosorción en los tiempos y concentraciones máximos evaluados, indicando que sería posible que aumente en mayores valores de dichos parámetros.
- Se recomienda usar más de dos tipos de marcadores moleculares ITS, para la identificación a nivel de especie.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Acosta I., Cárdenas J. y Martínez V. Ideas CONCYTEG. El uso de diferentes biomásas para la eliminación de metales pesados de sitios contaminados. 2012. 7(85): Pp. 911-922.

Acosta I., Moctezuma-Zárate M. G., Gutiérrez C., & Rodríguez X. Bioadsorción de Cromo (VI) en Solución Acuosa por la Biomasa Celular de *Cryptococcus neoformans* y *Helminthosporium* sp. 2005. *Información tecnológica*, 16(1), 11-15.

Aguirre, W., Fischer, G., & Miranda, M. Tolerancia a metales pesados a través del uso de micorrizas arbusculares en plantas cultivadas. 2011. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 5 (1), 141-153.

Ahmad, I., Ansari, M. I., & Aqil, F. Biosorption of Ni, Cr and Cd by metal tolerant *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp using single and multi-metal solution. 2006. *Indian Journal of Experiment Biology*. 44, 73 – 76.

Alexopoulos, C. J. & Mims, C. W. Introducción a la Micología. 1985. Ediciones Omega SA Barcelona, 638.

Anahid, S., Yaghmaei, S., & Ghobadinejad, Z. Heavy metal tolerance of fungi. 2011. *Scientia Iranica*, 18(3), 502-508.

Asociación Civil Centro de Cultura Popular Labor. Evaluación de la calidad de los recursos hídricos en la provincia de Pasco y de la Salud en el Centro Poblado de Paragsha. Cerro de Pasco, Perú. 2009.

Atkinson B.W., F. Bux, H.C. Kasan. Considerations for application of biosorption technology to remediate metal-contaminated industrial effluents. *Water SA*. 1998. 24, pp. 129-135.

Bader A. Etude de la dépollution des eaux usées par les champiñones filamenteux capables de séquestrer les lourds métaux. Thèse de Estado, Meknes, Marruecos. 1999.

Baig T.H., Garcia A.E., Tiemann K.J. y Gardea-Torresdey J.L. Adsorption of heavy metal ions by the biomass of *Salanum Elaeagnifolium* (Silverleaf nightshade). Conference on Hazardous Waste Research. 1999.131-142.

Bankar A. V., Kumar A. R. y Zinjarde S.S. Removal of chromium (VI) ions from aqueous solution by adsorption onto two marine isolates of *Yarrowia lipolytica*. Journal of Hazardous Materials. 2009. 170: 487-494.

Bellú S., S. García, J. González, A. Atria, L. Sala & S. Signorella. Removal of chromium (VI) and chromium (III) from aqueous solution by grainless stalk of corn. *Separation Science and Technology*. 2008. 43 (11-12): 3200-3220.

Beltrán-Pineda, M. E. & Gómez-Rodríguez, A. M. Biorremediación de Metales Pesados Cadmio (Cd), Cromo (Cr) y Mercurio (Hg), Mecanismos Bioquímicos e Ingeniería Genética: Una Revisión. 2016. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 172-197.

Buenfil-Rojas M. y Flores-Cuevas N. Determinación de metales pesados (As, Cd, Hg y Pb) presentes en el río Hondo, Quintana Roo. Vi Congreso Internacional y XII Nacional de Ciencias Ambientales. 2007.

Calzado L. Caracterización y categorización de los problemas ambientales de la minería en el Perú. Primer Simposio Nacional de Medio Ambiente y seguridad Minera. Colegio de Ingenieros del Perú. 1997.

Cañizares-Villanueva R. O. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista latinoamericana de microbiología*. 42:131-143. 2000.

Cárdenas-González J.F. & I. Acosta-Rodríguez. Remoción de Cromo Hexavalente por el Hongo *Paecilomyces* sp. Aislado del Medio Ambiente. Información Tecnológica. 2011. 22(1): 9-16.

Chatterjee N. 2006. Biosorption of cadmium by fungi. Project of degree, Master of Science in Biotechnology. Department of Biotechnology & Environmental Sciences. Thapar Institute of Engineering and Technology. Deemed University. Patiala, India.

Chen, J. P. Decontamination of heavy metals: processes, mechanisms, and applications. Crc Press. 2012.

Chirwa E. y Wang Y. Simultaneous chromium (VI) reduction and degradation in an anaerobic consortium of bacteria. Elsevier Science. 2000. 34(8): Pp. 2376-2384.

Congreso de la República. Informe de actividades de la semana de representación parlamentaria. 2012.

<[http://www2.congreso.gob.pe/Sicr/MesaDirectiva/sipfr2011.nsf/3B4178225845DC04052579FB005D46E2/\\$FILE/ValleRamirez_ENE2012.pdf](http://www2.congreso.gob.pe/Sicr/MesaDirectiva/sipfr2011.nsf/3B4178225845DC04052579FB005D46E2/$FILE/ValleRamirez_ENE2012.pdf)> (acceso 05/09/2016)

Couto, M. B., Reizinho, R. G., & Duarte, F. L. Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterize non-Saccharomyces yeasts present during red wine fermentations. (2005). International journal of food microbiology, 102(1), 49-56.

Crusberg T.C. Biomineralization of Copper by a Fungus Revealed by SEM. 2004. Microscopy and Analysis. 18 (1): 11 – 13.

Cruz D. Remoción de metales por microorganismos productores de polisacáridos. Tesis para obtener el grado de maestría en Tecnología avanzada. Instituto Politécnico Nacional. 2008.

Das, S. Biosorption and biotransformation of Cr (VI) by hexavalent chromium-stressed environmental fungal isolates from wastewater. 2014. Int J Adv Pharm Biol Chem. 3 (2), 378-383.

Das, S., & Dash, H. R. Handbook of Metal-microbe Interactions and Bioremediation. CRC Press. 2017.

Díaz M. P., Moctezuma M. G. y Acosta I. Aislamiento de hongos resistentes a metales pesados a partir de desechos mineros y su capacidad de remoción de Metales pesados y Flúor en solución. FEMISCA. 2002. 473-474.

Duca G., C. Nuñez, A. Navarro & C. Rubio. Remediación de Iones Cr (VI) en Soluciones Acuáticas por *Aspergillus niger* BM-56. Biotecnología. 2012. 16: 3.

Environmental Regulation of Mine Waters in South America (ERMISA). Estado de la Situación sobre la Gestión del agua en la Minería: El caso Peruano. 2006.

Espino-Saldaña A. F. Aislamiento y caracterización de hongos resistentes a cromatos nativos de desechos industriales. Tesis para obtener el la licenciatura en Química. Universidad de Guanajuato. 2002.

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. 1999. International Journal of Systematic and evolutionary microbiology, 49(1), 329-337.

Ezzouhri L., E. Castro, M. Moya, F. Espinola y K. Lairini. Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. African Journal of Microbiology Research. 2009. 3 (2): 035-048.

Filipović-Kovačević Z., Sipos L., Briški F. Biosorption of chromium, copper, nickel and zinc ions onto fungal pellets of *Aspergillus niger* 405 from aqueous solutions. Food Technology and Biotechnology, 2000, vol. 38, no 3, p. 211-216.

Gadd, G. M. & C. White. Microbial treatment of metal pollution—a working biotechnology? Trends in biotechnology. 1993. 11 (8), 353-359.

García M. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos tolerantes a metales pesados en el proceso de lodos activados en una planta de tratamiento de agua residual. Tesis para la obtener el grado de Maestro en Ciencias con especialidad en Microbiología. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas. División de Estudios de Postgrado. 2004.

García N. Producción de conidios de *Metarhizium anispliae* var *leptidiotum* en atmósferas oxidantes. Tesis para obtener el grado de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. 2012.

Gerday, C., Aittaleb, M., Bentahir, M., et al. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. 2000. Trends in biotechnology, 18(3), 103-107.

Gocheva, Y. G., Krumova, E. T., Slokoska, L. S., Miteva, J. G., Vassilev, S. V., & Angelova, M. B. Cell response of Antarctic and temperate strains of *Penicillium* spp. to different growth temperature. 2006. Mycological research, 110(11), 1347-1354.

Golder Associates Perú S.A. Plan de manejo ambiental de la laguna Yanamate. Resumen ejecutivo presentado a Volcán Compañía Minera S.A.A. Lima, Perú. 2000.

González Pombo, A. Identificación molecular y métodos de conservación de levaduras y hongos filamentosos de muestras provenientes de Antártida. Tesis de grado para la Licenciatura en Ciencias Biológicas. Universidad de la República. 2014.

Guarro, J., Gené, J., & Stchigel, A. M. Developments in fungal taxonomy. 1999. Clinical microbiology reviews, 12(3), 454-500.

Guevara D. Naranjo B. y Koch A. Biorremediación de cromo (cromo total y cromo VI) en agua sintética por dos inóculos bacterianos nativos compuestos a escala de laboratorio. 2011. Pp. 8.

Hefnawy, M. A., & Razab, A. A. Alteration of cell-wall composition of *Fusarium oxysporum* by copper stress. 1998. Folia microbiológica, 43(5), 453-458.

Helfgott F. (En línea). Apuntes de historia de Pasco y su relación con la minería. <<http://bibliotecavirtual.minam.gob.pe:8080/biam/minam/minam/1738>>. Acceso 15/07/2016. 2011.

Hermosa, M. R., Grondona, I., Iturriaga, E. T., Díaz-Minguez, J. M., Castro, C., Monte, E., & García-Acha, I. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. 2000. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1890-1898.

Hernández S. Propuesta de un sistema de lixiviación-biosorción con hongos filamentosos para la biorremediación de matrices contaminadas con plomo. Tesis para la obtención del grado de maestro en ciencias ambientales. Universidad Autónoma de Querétano. 2011.

Hernández-Velázquez S., M. Gutiérrez-Rojas & T.L. Volke-Sepúlveda. Capacidad de biosorción por la biomasa de dos hongos filamentosos. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. México. 2011.

Hibbett D.S., Binder M., Bischoff J.F. Blackwell M., Cannon P.F., Eriksson O.E., Huhndorf S., James, T., Kirk P.M. & Lücking R. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. 2007. *Mycol. Res.* 111, 509–547.

Hutchins, S. R., Davidson, M. S., Brierley, J. A., & Brierley, C. L. Microorganisms in reclamation of metals. *Annual Reviews in Microbiology*. 1986. 40(1), 311-336.

Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal

Iram S., Parveen K., Usman J., Nasir K., Akhlar N., Arouj S. y Ahmad I. Heavy metal tolerance of filamentous fungal strains isolated from soil irrigated with industrial wastewater. *Biologija*. 2012.58 (3). 107-116.

- Irazusta V., Michel L., de Figueroa L. I. C.** Biomineralización de cobre en *Candida fukuyamaensis* RCL-3. 2016. Rev. Argent Microbiol. 48 (2): 166 – 170.
- Kapoor, A., & Viraraghavan, T.** Biosorption of heavy metals on *Aspergillus niger*: effect of pretreatment. 1998. Bioresource Technology, 63(2), 109-113.
- Karakousis, A., Tan, L., Ellis, D., Alexiou, H., & Wormald, P. J.** An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. 2006. Journal of microbiological methods, 65(1), 38-48.
- Kavanagh K.** Fungi Biology and Applications. John Wiley & Sons, Ltd. Inglaterra. 2005. 297 pg.
- Larralde C. P.** Cinética de crecimiento de hongos filamentosos. Morfometría de los micelios de *A. niger* y *G. fujikuroi* y su posible utilización en la tasa específica de crecimiento. Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. 1996.
- Liyana N. Izzati Mohd N. A. & S. Guan.** Tolerance and biosorption of copper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem. Journal of Environmental Sciences. 2011. 23 (5): 824-830.
- Lutzoni Lab.** (en línea). Lutzoni Lab Lichenology & Phylogenetics. Nuclear Ribosomal ADN. <<http://lutzonilab.org/nuclear-ribosomal-dna/>>.2014.
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J.** Brock biología de los microorganismos. 2003.
- Maheshwari, D. K.** Practical Microbiology. 2002. S. Chand Publishing.
- Ministerio del Ambiente (MINAM).** (en línea). La situación del agua en el Perú. <<http://www.minam.gob.pe/cambioclimatico/situacion-del-agua-en-el-peru/>>. Acceso 29/12/2016. 2016.

Monge O., Valenzuela J., Acedo E., Certucha M. y Almendariz F. Biosorción de cobre en Sistemas por lote y continuo con bacterias anaerobias inmovilizadas en Zeolita natural (clinoptilolita). Rev. Int. Contam. Ambiental. 2008.24(3): Pp. 107-115.

Moore D., Robson G.D., Trinci A.P.J. 21st Century Guidebook to Fungi. 2011. Cambridge University Press.

More D. (En línea). David Moore's World of Fungi: where mycology starts. <http://www.davidmoore.org.uk/21st_Century_Guidebook_to_Fungi_PLATINUM/search.html>. Acceso 28/03/2017. 2017.

Moreno Z. Correlación de la tasa de crecimiento radial y la tasa de crecimiento específico de hongos filamentosos aislados de la planta *Espeletia barclayana*. Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. 2000. PP. 133.

Mullen M.D., Wolf D.C., Beveridge T.J. & G.W. Bailey. Sorption of heavy metals by the soil fungi *Aspergillus niger* and *Mucor rouxii*. Soil Biol. Biochem. 1992. 24: 129-135.

Muter O., Patmalnieks A. and Rapoport A. Interrelations of the yeast *Candida utilis*: metal reduction and its distribution in the cell and medium. 2001. Process Biochem. 36: 963-970.

Navarro-Aviño J.P., Aguilar I. y López-Moya J.R. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. Ecosistemas. 2007. 16 (2).

Nordstrom, D.K. y Alpers, C.N. Geochemistry of acid mine waters. 1999. The environmental geochemistry of mineral deposits. Reviews in Economic Geology, SEG, Littleton, CO. USA. (6A), 133-156.

Nuñez R. Técnicas in vitro para la biorremediación de cromo y plomo. Tesis para obtener el grado de bachiller en Ingeniería en Biotecnología. 2007. Instituto tecnológico de Costa Rica. Escuela de Biología.

Pamo, E. L., Aduvire, O., & Barettino, D. Tratamientos pasivos de drenajes ácidos de mina: estado actual y perspectivas de futuro. Boletín Geológico y minero. 2002. 113(1): 3-21.

Patterson, J. W. Metals speciation separation and recovery. CRC Press. 1987. Vol. 1.

Pelczar, M. & Reid, R. 1996. Microbiología. Cuarta Edición. Editorial McGraw Hill. México D.F. 458 Pp.

Pócsi, István. Toxic metal/metalloid tolerance in fungi, a biotechnology-oriented approach. In Cellular effects of heavy metals. 2011. Springer, Dordrecht. p. 31-58.

Pontón, J. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. Revista Iberoamericana de Micología. 2008. 25, 78-82.

Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. 2017. Journal of Natural Products, 80(3), 756-770.

Ramírez-Ramírez R., Calvo-Méndez C., Ávila-Rodríguez M., Lappe P., Ulloa M., Vázquez-Juárez R., & Gutiérrez-Corona J. F. Cr (VI) reduction in a chromate-resistant strain of *Candida maltosa* isolated from the leather industry. 2004. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85(1), 63-68.

Ratón, T. O. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. 2004. Revista Iberoamericana de Micología. 21:15-19.

Romero A., Flores S. Y Medina R. Estudio de los metales pesados en el relave abandonado de Ticapampa. Revista del Instituto de Investigaciones FIGMMG. 2008. 11(22): Pp. 13-16.

Sakthivel, M., Ayyasamy, P. M., & Hemalatha, N. Biotransformation of chromium (Cr-VI to Cr III) from tannery effluent using bacteria and fungi. 2016. Int. J. Adv. Res. Biol. Sci, 3(11), 68-79.

Sala L. F., S. I. García, J. C. González, M. I. Frascaroli, S. Bellú, F. Mangiameli, P. Blanes, M. H. Mogetta, V. Andreu, A. M. Atria, and J. M. Salas. Biosorción para la eliminación de metales pesados en aguas de desecho. An. La Real Soc. Española Química. 2010. vol. 106, no. 2, pp. 114-120.

Sarret G., Manceau A., Sapdini L., Claude Roux J., Lous Hazemann J., Soldo Y., EybertBerard L., Jacques Menthonnex J. Structural Determination of Zn and Pb Binding Sites in *Penicillium chrysogenum* Cell Walls by EXAFS Spectroscopy. 1998. Environ Sci Technol 32:1648-55.

Selbmann L., G.S. de Hoog, L. Zucconi, D. Isola, S. Ruisi, A.H.G. Gerrits van den Ende, C. Ruibal, F. De Leo, Urzi C. & S. Onofri. Drought meets acid: Three new genera in a dothidealean clade of extremotolerant fungi. Studies in Mycology 2008. 61: 1-20.

Shumate II, S. E. y G. W. Strandberg. Accumulation of metals by microbial cells. M. Moo-Young, C. N. Robinson, y J. A. Howell (eds.). Pergamon Press, New York. 1985. Vol. 4, pp. 235-247.

Siddiquee S. Practical Handbook of the Biology and Molecular Diversity of *Trichoderma* Species from Tropical Regions. 2017. Springer International Publishing.

Slemmons, C., Johnson, G., & Connell, L. B. Application of an automated ribosomal intergenic spacer analysis database for identification of cultured Antarctic fungi. 2013. Antarctic Science, 25(1), 44-50.

- Srivastava S., & Thakur I. S.** Biosorption potency of *Aspergillus niger* for removal of chromium (VI). 2006. *Current microbiology*, 53(3), 232-237.
- Suárez P. & R. Reyes.** La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. *Interciencia*. 2002. 27: 160-164.
- Sukumar, M.** Reduction of hexavalent chromium by *Rhizopus oryzae*. 2010. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 4(7), 412-418.
- Tobin, J. M., Cooper, D. G., & Neufeld, R. J.** Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. 1984. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(4), 821-824.
- Travis H., P.C Iwen. & S.H. Hinrichs.** Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000. 38 (4):1510-5.
- Tsezos M. & B. Volesky.** Biosorption of Uranium and Thorium. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. XXIII. 1980. Pp. 583-604.
- Tuttle, J. H., C. I. Randles, and P. R. Dugan.** Activity of microorganisms in acid mine water. I. Influence of acid water on aerobic Heterotrophs of a Normal Stream. 1968.
- Valverde, Á.** Taxonomía polifásica de poblaciones de microorganismos que establecen simbiosis con *Phaseolus vulgaris*. 2003.
- Vargas Vera, Roy Heradio.** Antagonismo de *Trichoderma Koningiopsis* y *Trichoderma Harzianum* sobre *Fusarium Oxysporum* f. sp. *cepae* y *Phoma Terrestris* in Vitro. 2014.
- Vargas, A. & Villamizar, D.** Estudio preliminar de la producción, extracción y purificación de T2 toxina por *Fusarium sporotrichioides* NRRL 3299 en dos medios sintéticos. *Microbiólogo Industrial*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. 2005. 172 Pp.

Vieira, G. R. T., Liebl M., Ballod, L. B., Paulert, R. y Smania A. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and antimicrobial metabolites by *Polyporus tricholoma* Mont. Brazilian Journal of Microbiology, 2008, vol. 39, no 3, p. 561-568.

Vijayaraghavan, K. & Balasubramanian, R. Is biosorption suitable for decontamination of metal-bearing wastewaters? A critical review on the state-of-the-art of biosorption processes and future directions. Journal of environmental management. 2015. 160, 283-296.

Vijayaraghavan, K. & Yun, Y. S. Bacterial biosorbents and biosorption. Biotechnology advances, 2008, 26(3), 266-291.

Vilgalys Mycology Lab. Conserved primer sequences for PCR amplification of fungal rDNA. Duke University. < https://sites.duke.edu/vilgalyslab/rdna_primers_for_fungi/ >. 2018.

Viraraghavan T. & A. Srinivasan. Fungal Biosorption and Biosorbents. Microbial Biosorption of Metals, New York, Springer, Science Business. 2011. pp. 143-158.

Volcán Compañía Minera S.A.A. Investigación Hidrogeológica de la Mina Subterránea y de las Facilidades Superficiales de la Unidad Minera Cerro de Pasco. Informe preliminar. 2006.

Volesky B. Biosorption and me. Water Res. 2007. 41:4017-4029.

Volesky B. en Biosorption of Heavy Metals. CRC Press, Boca Raton. 1990. pp. 139-172

Voronin L. V. The Fungi of Small Acid Lakes. Inland Water Biology. 2010. 3 (3): 254-259.

Vullo D.L. Microorganismos y metales pesados una interacción en beneficio del medio ambiente. Revista Química Viva. 2003. Vol. 2, número 3.

Wade C., Bold B. y Fontboté L. Geochemistry and mineralogy of the Quiulacocha tailings impoundment from the polymetallic Pb-Zn-Ag-Bi-Cu mineralization Cerro de Pasco, Perú. 7th International Conference on Acid Rock Drainage (ICARD). 2006.

Walsh. EIAS del Proyecto de Transporte de Gas Natural de Ayacucho a la Planta de Licuefacción: 5. Anexo. 4.2.2. 1-4.
<[http://ifcext.ifc.org/ifcext/spiwebsite1.nsf/0/00DB06A86B84D253852576BA000E2AF0/\\$File/ESIA%20Pipeline%20Principale%20caracteristica%20de%20los%20puntos%20de%20mu.pdf](http://ifcext.ifc.org/ifcext/spiwebsite1.nsf/0/00DB06A86B84D253852576BA000E2AF0/$File/ESIA%20Pipeline%20Principale%20caracteristica%20de%20los%20puntos%20de%20mu.pdf)>. Acceso 05/01/2017. 2005.

Wang J.S., X.J. Hu, Y.G. Liu, S.B. Xie & Z.L. Bao. Biosorption of uranium VI by immobilized *Aspergillus fumigatus* beads, J Environ Radioact. 2010. 101, pp. 505-508.

Wang, J., & Chen, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. 2009. Biotechnology advances, 27(2), 195-226.

WARCUP J. The Soil Plate Method for Isolation of Fungi from soil. Nature. 1950. 166: 117-118.

Wurzbacher C. M., Barlocher F. y Grossart H. P. Fungi in lake ecosystems. Aquatic Microbial Ecology. 2010. 59: 125-149.

Yamazaki A., K. Toyoma y A. Nakagiri. A new acidophilic fungus *Teratosphaeria acidotherma* (Capnodiales, Ascomycota) from a hot spring. Mycoscience. 2010. 51: 443-455.

Zafar, S., Aqil, F., & Ahmad, I. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. 2007. Bioresource technology, 98(13): 2557-2561.

Zelayarán G., Souza F. V., Coutinho L., Cristina S., Duraea L. y Meleiro A. L. Growth curves of filamentous fungi for utilization in biocatalytic reduction of cyclohexanones. Global Journal of Science Frontier Research Chemistry. 2013. 13 (5).

Zeng, Xiao-xi, Li-yuan Chai, Jian-xin Tang, Xue-duan Liu, & Zhi-hui Yang.

Taxonomy characterization and cadmium biosorption of fungus strain. The Transactions of Nonferrous Metals Society of China. 2013. 23: 2759-2765.

Zhou, J. L. Zn biosorption by *Rhizopus arrhizus* and other fungi. 1999. Applied microbiology and biotechnology, 51(5): 686-693.

11. ANEXO

Anexo A. Medios de cultivo

Medio YPG (g/L)

Glucosa	30.00
Extracto de levadura	10.00
Peptona	5.00
Agar	18.00
Agua destilada	1000 ml

Medio Czapek modificado (g/L)

Glucosa	30.00
Nitrato de Sodio	2.00
Fosfato dipotásico	1.00
Sulfato de Magnesio	0.50
Cloruro de potasio	0.50
Sulfato ferroso	0.01
Ácido cítrico	0.01
Extracto de levadura	1.00
Extracto de Malta (*)	1.00
Agua destilada	1000 ml
pH 5.0	

(*) Solo lo adicioné en los casos que deseaba aumentar la producción de biomasa.

Medio Mínimo de Davis modificado (MMD) (g/L)

Glucosa	20.00
NH ₄ Cl	1.00
NaCl	0.50
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.20
KH ₂ PO ₄	3.00
Na ₂ HPO ₄	3.00
Ácido cítrico	2.00
Extracto de levadura	1.00
Extracto de malta	1.00
Agua destilada	1000 ml

Anexo B. Zona de muestreo, muestras y parámetros fisicoquímicos

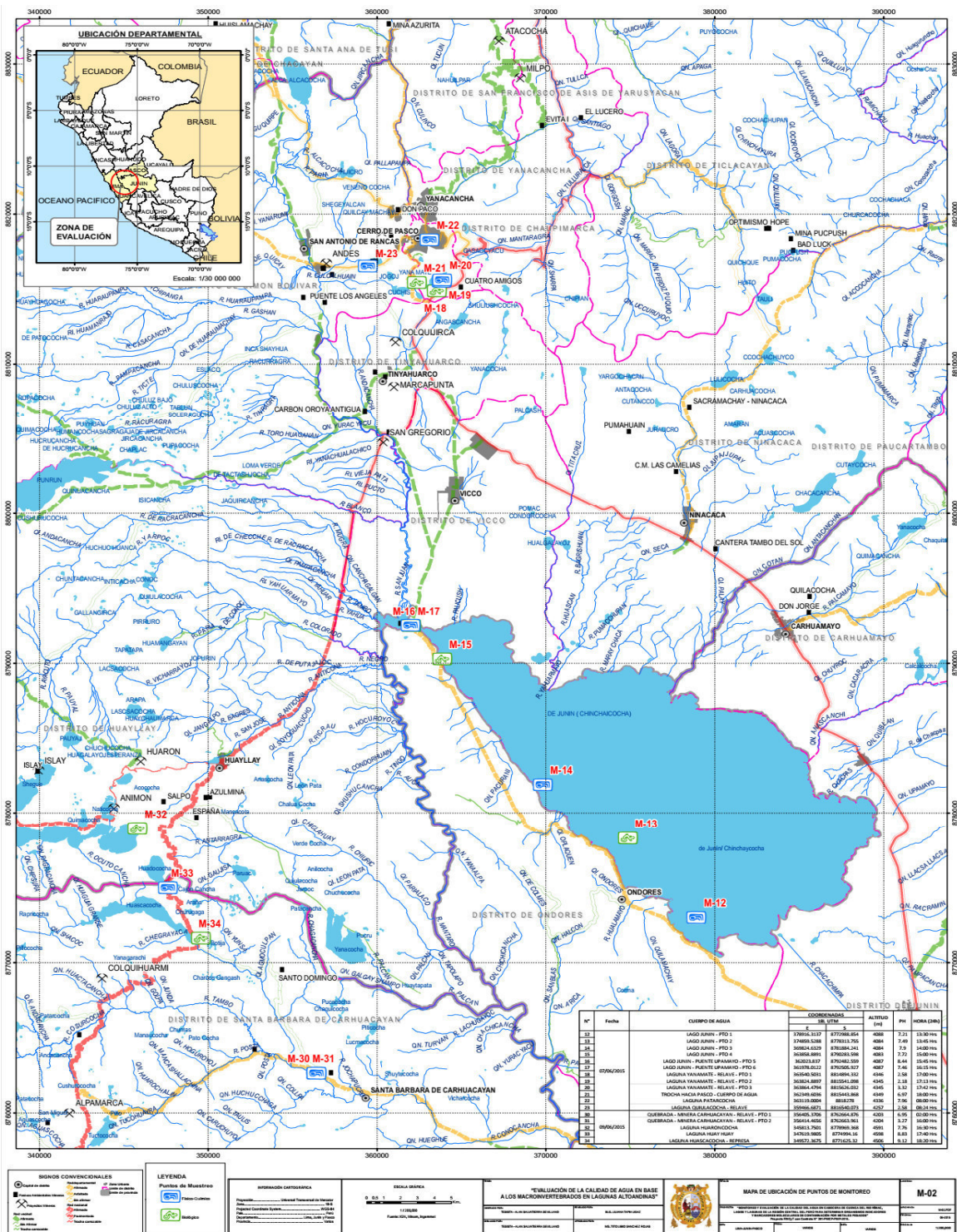


Figura 25. Mapa con puntos de muestreo del presente proyecto FINCyT Región Lima, Pasco y Junín. (Fuente: FINCyT contrato N° 391, 2015)

Tabla 6. Zonas de muestreo y caracterización fisicoquímica de las muestras de agua

SALIDA	ESTACIÓN	NOMBRES DE ESTACIONES*	COORDENADAS UTM 18L		Altitud (msnm)	pH	Conductividad $\mu\text{S/cm}$	SDT ppt	Temperatura $^{\circ}\text{C}$
			Este	Sur					
/	M 18	Relavera Yanamate – relave – punto 1	363540.50	8814894.33	4346	2.58	4040	2.12	10.70
	M 19	Relavera Yanamate – relave – punto 2	363824.88	8815541.09	4345	2.18	12320	6.27	13.60
	M 30	Quebrada - Minera Carhuacayan - Relave - Pto 1	356405.37	8762664.88	4203	6.95	1650	0.83	14.60
	M 31	Quebrada - Minera Carhuacayan - Relave - Pto 2	356414.47	8762663.96	4204	3.27	1320	0.66	13.20
//	M 12	Relave Huarón Punto 1	347236.24	8782968.66	4440	7.48	900	0.52	11.00
	M 13	Relave Huarón punto 2	346913.00	8782988.00	4420	7.92	600	0.52	11.00
	M 18	Relavera Yanamate – Relave - 1	363501.61	8814730.84	4349	2.40	5200	0.08	10.60
	M19	Relavera Milpo pto 1	366828.47	8825868.98	3991	6.82	420	0.70	11.40
///	M 20	Relavera Milpo pto 2	366828.47	8826009.56	3991	7.14	1600	0.80	14.00
	M 27	Laguna Santa Catalina	371939.04	8716738.02	4847	4.60	1150	0.56	13.40
	M 18	Relavera Yanamate – relave - 1	363130.00	8814992.00	4212	1.74	3999	2.00	10.00
	M 18-1	Relavera Yanamate – relave - 2	363068.00	8815045.00	4274	1.71	3999	2.00	10.50
	M 18-2	Relavera Yanamate – relave - 3	363112.90	8814958.00	4336	1.73	2173	1.09	11.00
	M 9	Milpo Punto 1	366592.00	8825545.00	4026	7.36	960	503.00	-
	M 10	Milpo Punto 2	366593.00	8825545.00	4020	6.77	1140	566.00	-
	M 12	Desembocadura río San Juan	360851.00	8792335.00	4082	7.08	126	63.00	-
	M 13	Río San Juan punto 1	638362.78	1198772.95	4082	7.12	-	-	-
	M 14	Río San Juan punto 2	638380.84	1198813.58	4082	7.62	-	-	-
	M 03	Laguna Santa Catalina	628059.68	1283010.98	4837	4.14	116	-	-
ECA (Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM). Cuerpos de agua Categoría 4					6,5 a 9,0		1000	N.A.	N.A.

Leyenda:

SDT: Sólidos Disueltos Totales.

UTM: Universal Transversal Mercator, en referencia a las coordenadas Universales Transversales de Mercator.


$\mu\text{S/cm}$: Microsiemens/centímetro

Tabla 7. Caracterización de los metales pesados de las muestras, mediante el método ICP-Masas.

Metales* (mg/L)	SALIDAS DE MUESTREO											ECA (Decreto Supremo N° 004- 2017-MINAM). Categoría 4
	I (junio 2015)			II (noviembre 2015)				III (noviembre 2016)				
	Laguna Yanamate	Minera Carhuacayan	Relavera Huarón	Laguna Yanamate	Relavera Milpo	Laguna Santa Catalina	Laguna Santa Catalina	Laguna Yanamate	Relavera Milpo	Río San Juan		
Aluminio	185.5	23.2	0.444	73.1	3.2	1.1356	39	272.5	3.6	19.5	-	
Antimonio	0.409	<0.010	0.147	0.319	0.021	<0.010	<0.010	1.48	<0.010	<0.01	0.64	
Arsénico	25.8	0.232	0.057	12.7	0.069	0.012	1.475	40	0.149	0.41	0.15	
Bario	<0.0003	0.0045	0.0165	<0.0003	0.007	0.0065	0.281	<0.0003	0.053	0.4825	0.7	
Berilio	0.008	0.005	<0.003	<0.003	<0.003	<0.003	<0.003	0.008	<0.003	<0.003	-	
Boro	9.9	0.314	1.093	4.45	0.358	0.019	0.242	10.1	0.532	0.232	-	
Cadmio	1.5	0.208	0.006	0.5	0.008	0.008	0.084	1.3	28	0.023	0.00025	
Cinc	516	53.7	0.982	152	1.139	2.226	18.7	430.9	2.7	9.2	-	
Calcio	354.7	109.4	272.4	546	317.8	11.19	19.79	765.5	562	509.8	-	
Cobalto	0.095	0.042	0.005	0.043	0.005	<0.003	0.017	0.109	0.009	0.025	-	
Cobre	52.9	1.4	0.3	26.5	0.083	0.031	1.1	67.6	0.5	4.9	0.1	
Cromo	0.073	<0.007	0.88	0.037	0.014	N.D.	0.008	0.114	0.015	0.011	0.011	
Hierro	2596.5	70.85	1.054	1044	4.451	0.291	51.6	2748	13.27	47.1	-	
Magnesio	716	35	3.03	104	47	1.35	6.01	327	57	32	-	
Manganeso	362.75	4.15	0.4915	60.2	1.525	3.42	8.35	167.1	7.3	9.98	-	
Mercurio	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	0.0001	
Molibdeno	<0.004	<0.004	0.128	<0.004	0.017	<0.004	<0.004	<0.004	0.029	<0.004	-	
Níquel	0.188	0.047	<0.013	0.073	0.016	N.D.	0.017	0.198	0.014	0.039	0.052	
Plomo	0.135	0.355	0.3	0.217	0.6	<0.058	4.1	0.145	1.3	2.6	0.0025	
Selenio	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.016	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	0.005	
Talio	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	0.026	<0.016	<0.016	<0.016	0.0008	
Vanadio	0.31	0.0009	<0.002	0.137	0.009	<0.002	0.034	0.404	0.012	0.158	-	

*Método: Inductively Coupled Plasma (ICP) o Espectrómetro de Plasma Inducido-Muestras analizadas en el Instituto de Corrosión de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

 : Concentraciones de metales reportados como Estándar Calidad Ambiental (ECA)-Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM.

 : Concentraciones de metales que superan ECA Nacionales por ICP-MS.

Anexo C. Resistencia/tolerancia a Cr VI y Cd II de las cepas fúngicas aisladas

Tabla 8. Resistencia/tolerancia de Cepas fúngicas a diferentes concentraciones de Cr VI y Cd II en medio líquido.

CÓDIGO DE CEPA	Cr VI (ppm)												Cd II (ppm)											
	50	100	150	200	250	300	400	500	600	700	800	50	100	150	200	250	300	400	500	600	700	800		
MRYP1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MCJ1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MCJ2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MSCJ2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MSCJ1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MRYP2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
MRMP1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-		
MRHP1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-		
MRMP2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MRYP4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-		
MSCJ3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-		
MRYP3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MSJ1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MRYP9	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

(+): Presentó crecimiento; (-): No creció

Las lecturas se realizaron cada 3 días, y se incubó hasta 15 días.

Anexo D. Crecimiento de los hongos filamentosos a diferentes temperaturas y pH

Tabla 9. Crecimiento de los hongos en placa (mm) a diferentes temperaturas

		Trichoderma asperellum (MRYP4)					Trichoderma sp (MRMP1)					Trichoderma koningiopsis (MSCJ3)				
Temperatura (°C)		6.70	20.00	25.00	30.00	30.00	6.70	20.00	25.00	30.00	6.70	20.00	25.00	30.00		
Réplica	1	0.00	69.00	66.00	81.57	81.57	1.93	64.33	53.67	12.67	3.25	39.50	51.07	18.93		
	2	0.00	66.00	73.00	81.47	81.47	1.68	53.33	58.67	13.67	4.50	41.50	44.07	19.27		
	3	0.00	66.67	72.67	81.67	81.67	2.20	55.33	56.67	13.33	6.00	39.17	51.40	19.60		
Promedio		0.00	67.2	70.6	81.6	81.6	1.9	57.7	56.3	13.2	4.6	40.1	48.8	19.3		
Desviación Estándar		0.00	1.58	3.95	0.10	0.10	0.26	5.86	2.52	0.51	1.38	1.26	4.14	0.33		

Tabla 10. Crecimiento de hongos en placa (mm) a diferentes pH

		<i>Trichoderma asperellum</i> (MRYP4)						<i>Trichoderma</i> sp (MRMP1)						<i>Trichoderma koningiopsis</i> (MSCJ3)					
pH		2	3	4	5	6	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6			
Réplica	1	19.67	43.00	48.67	74.00	68.00	8.00	53.33	65.00	64.67	65.33	9.00	50.67	67.67	73.00	71.00			
	2	26.33	43.33	57.33	75.00	71.67	8.67	53.67	65.00	67.33	65.67	9.33	53.00	66.33	73.67	71.00			
	3	23.00	43.00	51.33	73.00	71.00	11.67	51.00	65.00	62.33	65.33	7.67	52.67	67.33	73.67	71.33			
Promedio		23.00	43.11	52.44	74.00	70.22	9.44	52.67	65.00	64.78	65.44	8.67	52.11	67.11	73.44	71.11			
Desviación Estándar		3.33	0.19	4.44	1.00	1.95	1.95	1.45	0.00	2.50	0.19	0.88	1.26	0.69	0.38	0.19			

Anexo E. Biosorción de Cd II por biomasa Fúngica en solución acuosa

Tabla 11. Porcentaje de biosorción de Cr VI por cepa viva de *Trichoderma asperellum* (MRYP4) y *Trichoderma* sp (MRMP1) en caldo Czapek.

Código de Cepa	Concentración del metal en medio Czapek (ppm)	Tiempo (horas)	Concentración del metal en el sobrenadante (ppm)	Biosorción por cada cepa (ppm)	Porcentaje de Biosorción (%)
MRYP4	57	48	54.00	3.00	5%
		72	49.50	7.50	13%
		108	49.00	8.00	14%
		144	46.00	11.00	19%
	22.8	36	21.50	1.30	6%
		60	20.30	2.50	11%
		84	20.10	2.70	12%
		108	19.13	3.67	16%
		132	18.27	4.53	20%
	12.5	36	11.83	0.67	6%
		60	10.90	1.60	13%
		84	10.70	1.80	15%
		108	10.60	1.90	15%
		132	11.40	1.10	9%
MRMP1	30.6	36	28.87	1.73	6%
		60	26.87	3.73	12%
		84	23.97	6.63	22%
		108	16.17	14.43	47%
		132	18.70	11.90	39%

Tabla 12. Porcentaje de biosorción de Cd II por cepa viva de *Trichoderma asperellum* (MRYP4) y *Trichoderma* sp (MRMP1) en caldo Czapek.

Código de Cepa	Concentración del metal en medio Czapek (ppm)	Tiempo (horas)	Concentración del metal en el sobrenadante (ppm)	Biosorción por cada cepa (ppm)	Porcentaje de Biosorción (%)
MRYP4	36	48	35.0	1.00	3%
		72	30.5	5.50	15%
		108	29.5	6.50	18%
		144	31.0	5.00	14%
	23.3	36	14.52	8.78	38%
		60	10.82	12.48	54%
		84	6.21	17.09	73%
		108	7.54	15.76	68%
		132	7.01	16.29	70%
	10.7	36	7.60	3.10	29%
		60	6.44	4.26	40%
		84	3.72	6.98	65%
		108	3.81	6.89	64%
		132	4.18	6.52	61%
MRMP1	21	36	16.00	5.00	24%
		60	15.54	5.46	26%
		84	13.61	7.39	35%
		108	13.43	7.57	36%
		132	16.60	4.40	21%

Anexo F. Imágenes

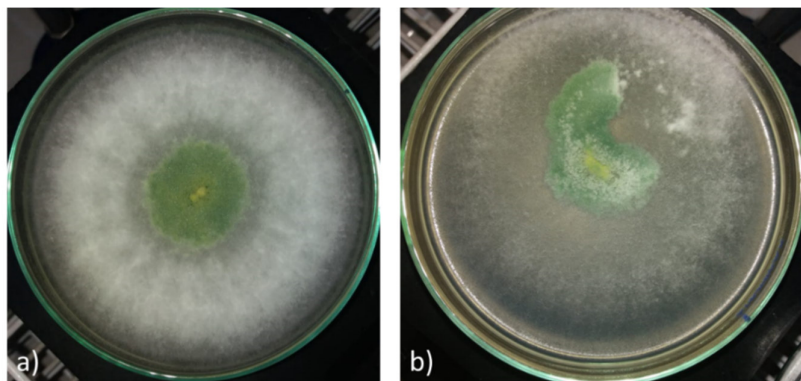


Figura 26. Morfología en placa. Cepa *Trichoderma asperellum* (MRYP4) con 5 días de incubación. En medios de cultivos a pH 5.5: a) APD, b) Czapek.

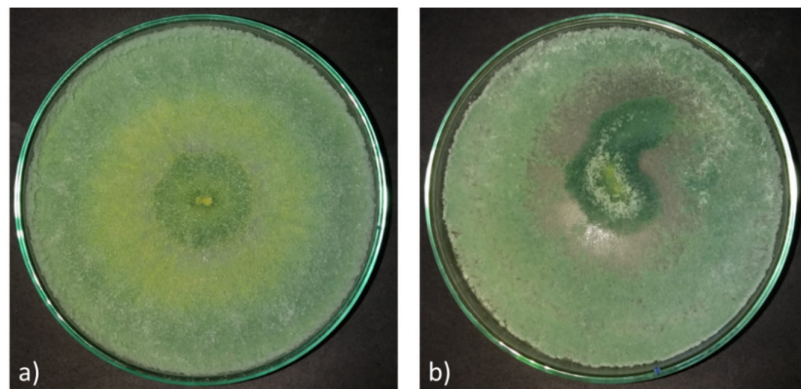


Figura 27. Morfología en placa. Cepa *Trichoderma asperellum* (MRYP4) con 8 días de incubación. En medios de cultivos a pH 5.5: a) APD, b) Czapek.

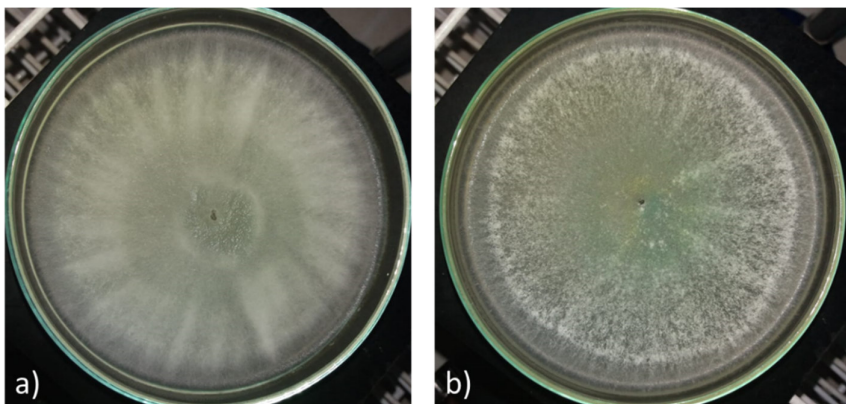


Figura 28. Morfología en placa. Cepa *Trichoderma* sp (MRMP1) con 5 días de incubación. En medios de cultivos a pH 5.5: a) APD, b) Czapek.

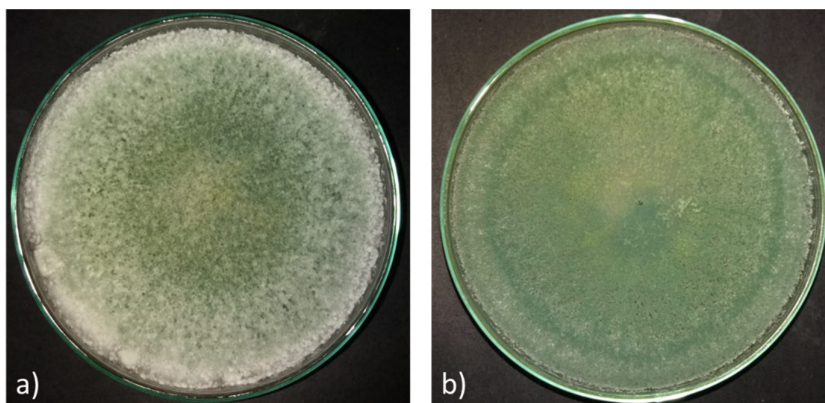


Figura 29. Morfología en placa. Cepa *Trichoderma* sp (MRMP1) con 8 días de incubación. En medios de cultivos a pH 5.5: a) APD, b) Czapek.

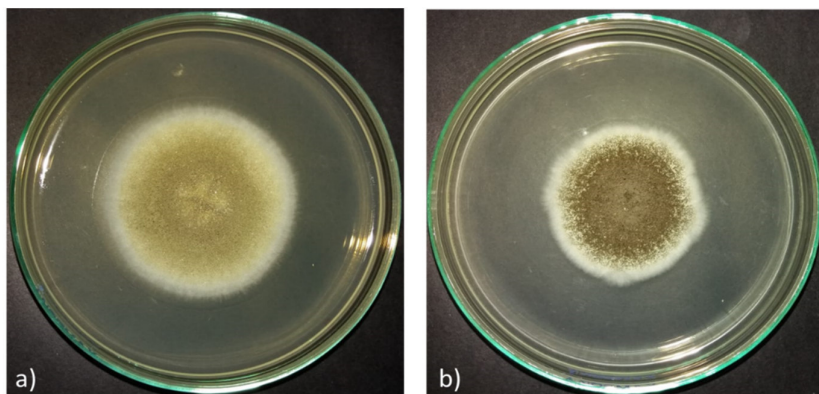


Figura 30. Morfología en placa. Cepa *Aspergillus* sp (MRYP9) con 8 días de incubación. En medios de cultivos a pH 5.5: a) APD, b) Czapek.

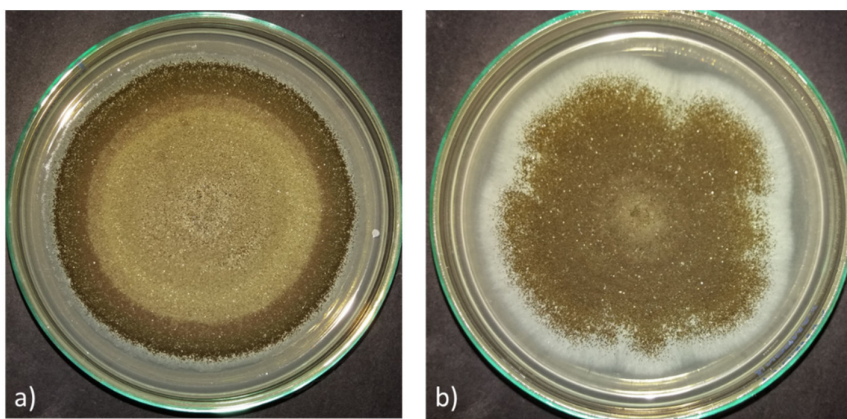


Figura 31. Morfología en placa. Cepa *Aspergillus* sp (MRYP9) con 14 días de incubación. En medios de cultivos a pH 5.5: a) APD, b) Czapek.

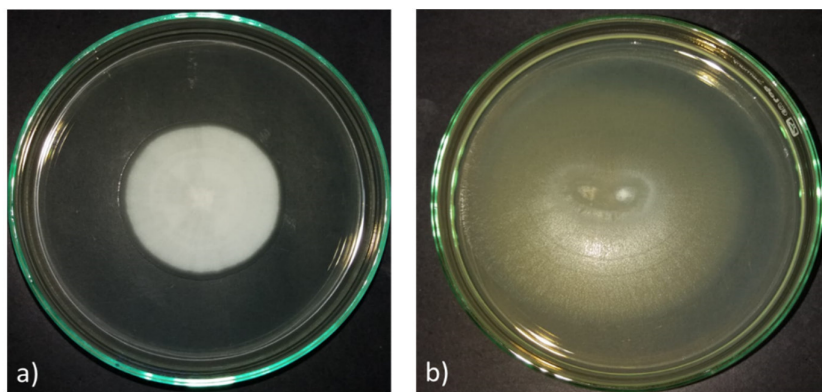


Figura 32. Morfología en placa. Cepa *Galactomyces candidum* (MSJJ2) con 8 días de incubación. En medios de cultivos a pH 5.5: a) APD, b) Czapek.

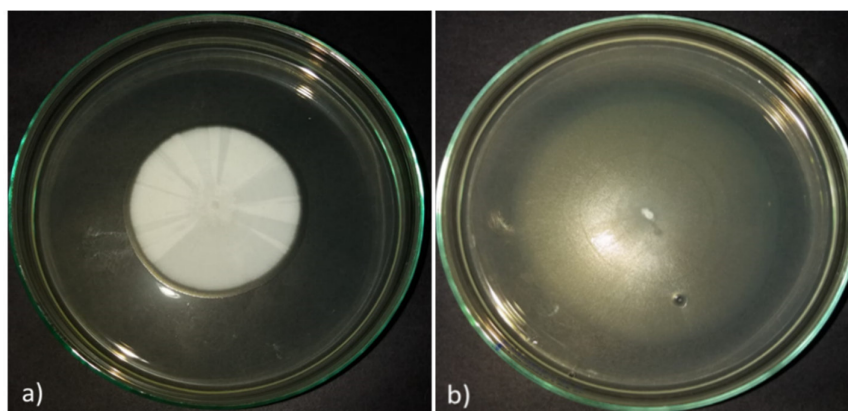


Figura 33. Morfología en placa. Cepa *Geotrichum* sp (MRYP3) con 8 días de incubación. En medios de cultivos a pH 5.5: a) APD, b) Czapek.

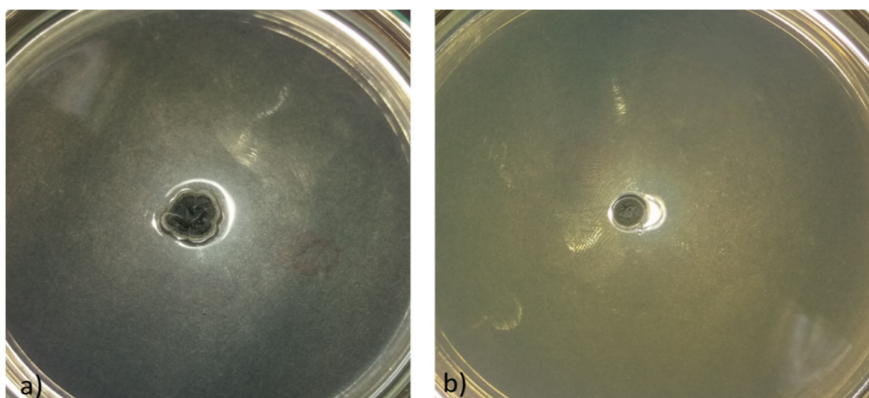


Figura 34. Morfología en placa. Cepa MRYP7, no identificada, con 8 días de incubación. En medios de cultivos a pH 5.5: a) APD, b) Czapek.

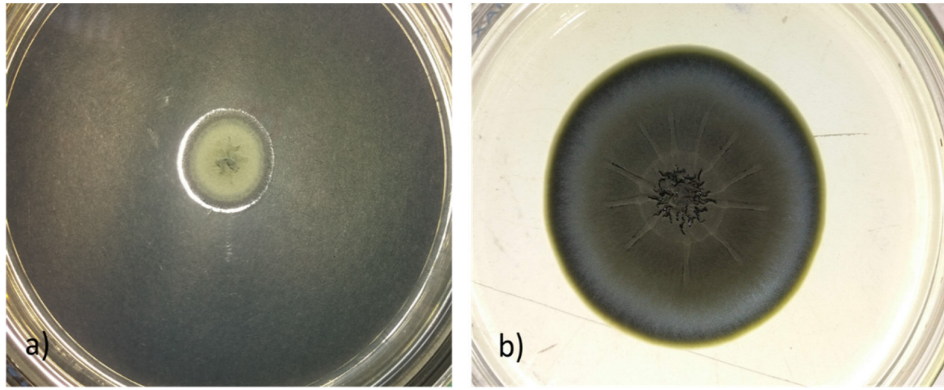


Figura 35. Morfología en placa. Ceba *Penicillium* sp 11 (MRYP8) en medio APD a pH 5.5 con: a) 14 días y b) 52 días de incubación.

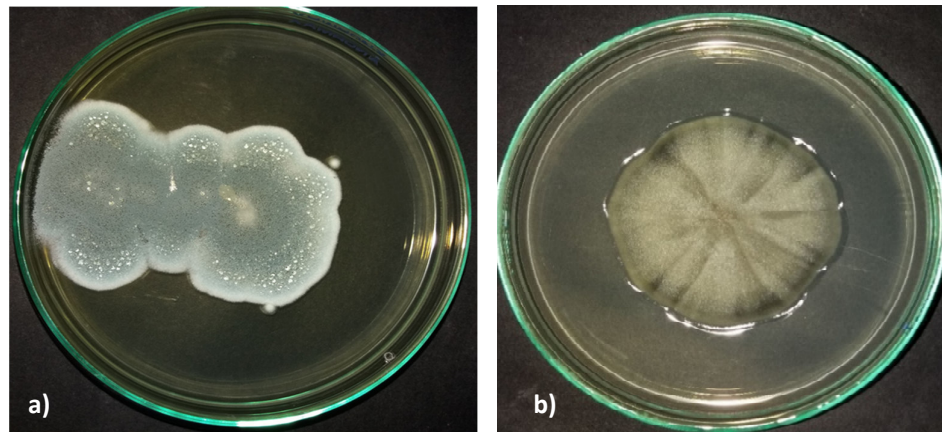


Figura 36. Morfología en placa. a) Ceba *Penicillium* sp 10 (MRYP6) y b) Ceba *Penicillium* sp 4 (MRHP1), ambas en medio APD a pH 5.5 con 14 días de incubación a 25 °C.

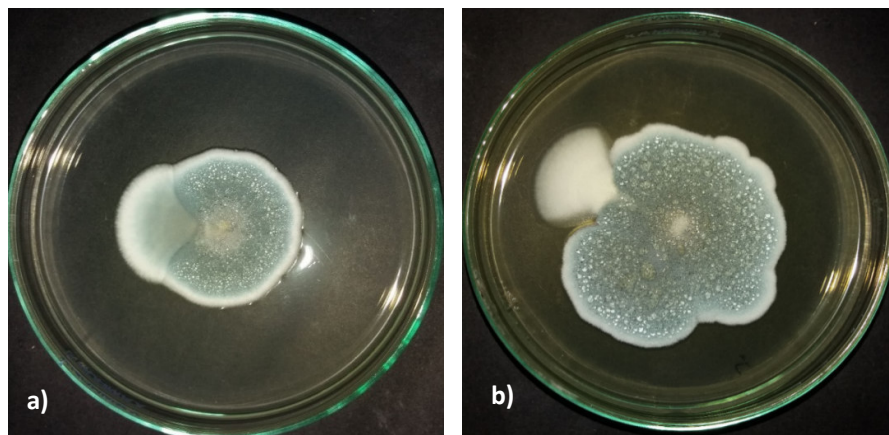


Figura 37. Morfología en placa. a) Ceba *Penicillium* sp 2 (MCJ2) y b) Ceba *Penicillium* sp 7 (MSCJ2), ambos en medio APD a pH 5.5 con 14 días de incubación a 25 °C.

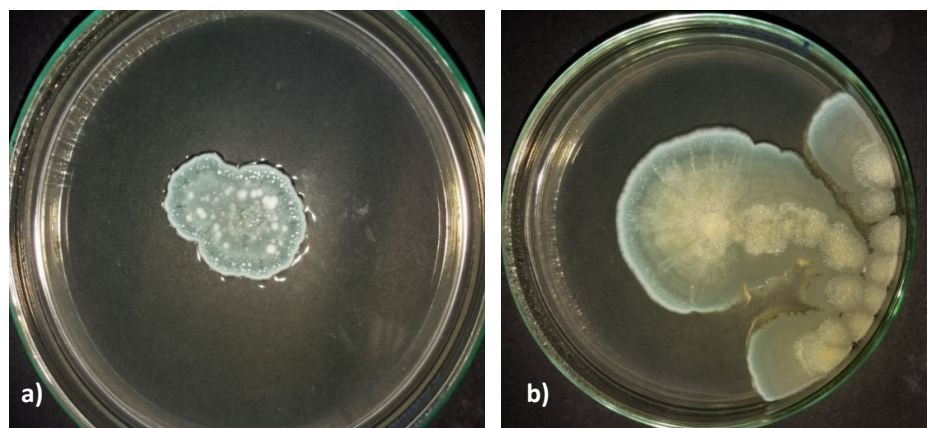


Figura 38. Morfología en placa. a) Ceba *Penicillium* sp 8 (MRMP2) y b) Ceba *Penicillium* sp 1 (MRYP1), ambos en medio APD a pH 5.5 con 14 días de incubación a 25 °C.

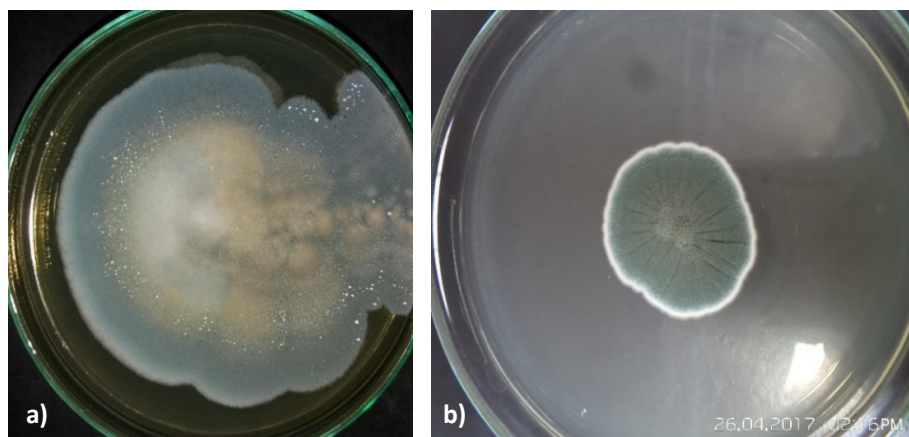


Figura 39. Morfología en placa. a) Ceba *Penicillium* sp 2 (MCJ1) con 14 días y b) Ceba *Penicillium* sp 5 (MRYP2) con 7 días de incubación a 25 °C, ambos en medio APD a pH 5.5.

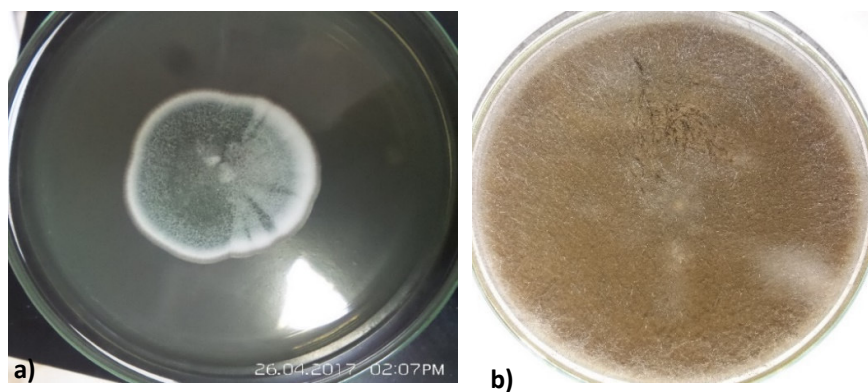


Figura 40. Morfología en placa. a) Ceba *Penicillium* sp 6 (MSCJ1) con 7 días y b) Ceba *Mucor racemosus* MSJJ1 con 14 días de incubación a 25 °C, ambos en medio APD a pH 5.5.

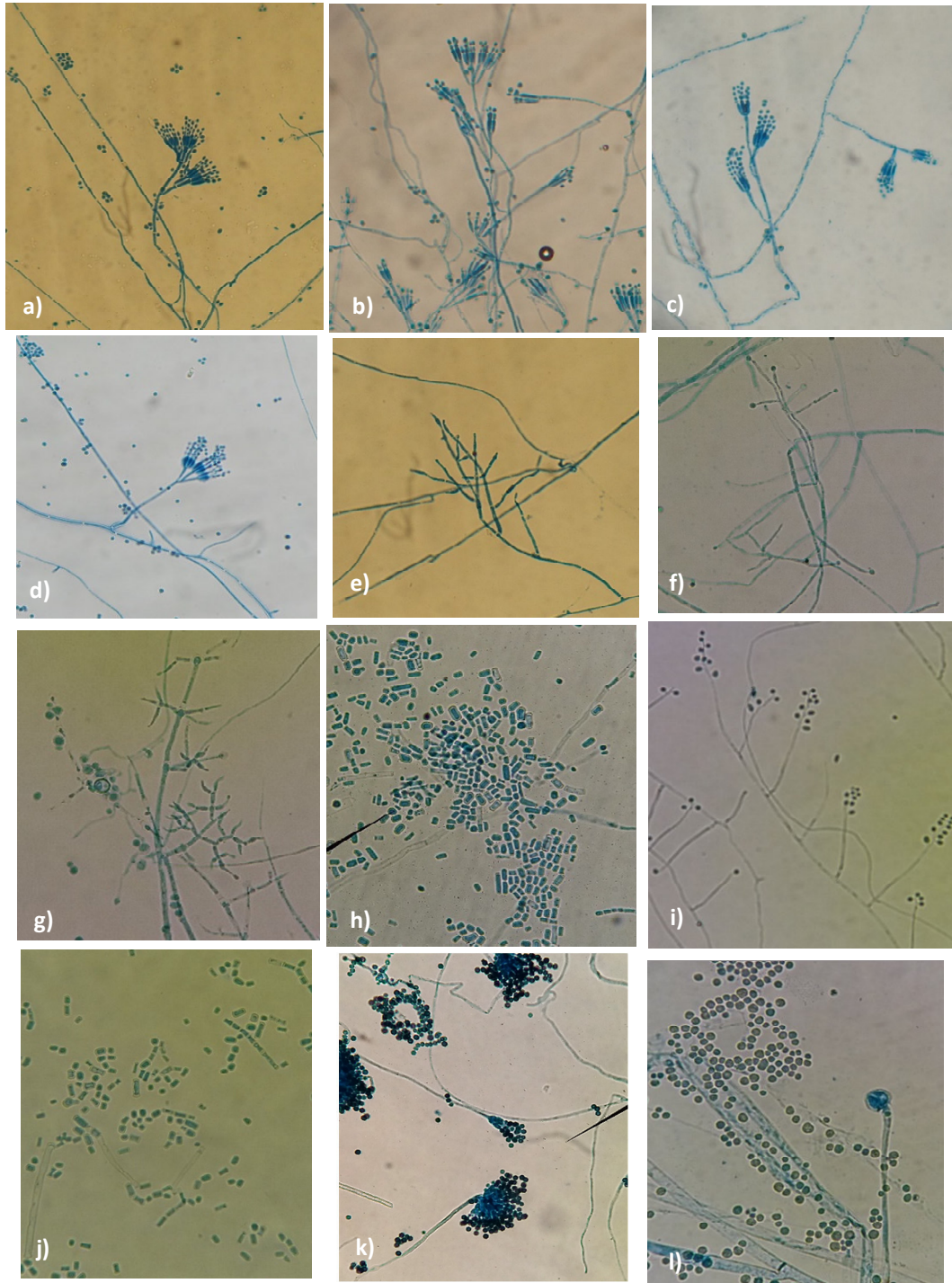


Figura 41. Microcultivos de las cepas representativas: a) *Penicillium* sp 5 (MRYP2), b) *Penicillium* sp 1 (MRYP1), c) *Penicillium* sp 7 (MSCJ2), d) *Penicillium* sp 6 (MSCJ1) e) *Trichoderma* sp (MRMP1), f) *Trichoderma koningiopsis* (MSCJ3), g) *Trichoderma asperellum* (MRYP4), h) *Geotrichum* sp (MRYP3), i) *Acidothrix acidophila* (MRYP5), j) *Galactomyces candidum* (MSJJ2), k) *Aspergillus* sp (MRYP9) y l) *Mucor racemosus* (MSJJ1). Observación en microscopio a 40x.

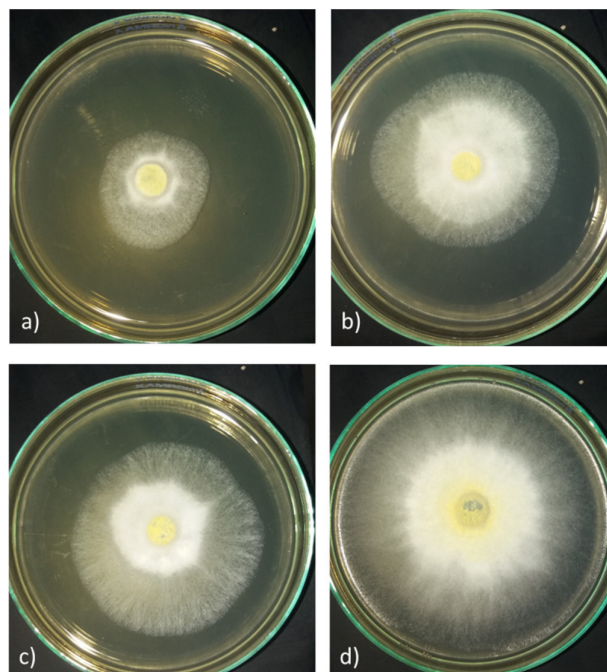


Figura 42. Morfología en placa de la Cepa *Trichoderma asperellum* (MRYP4) con 3 días de incubación en agar YPG, a 25 °C, a diferentes pH: a) pH 2.0, b) pH 3.0, c) pH 4.0, d) pH 5.0.

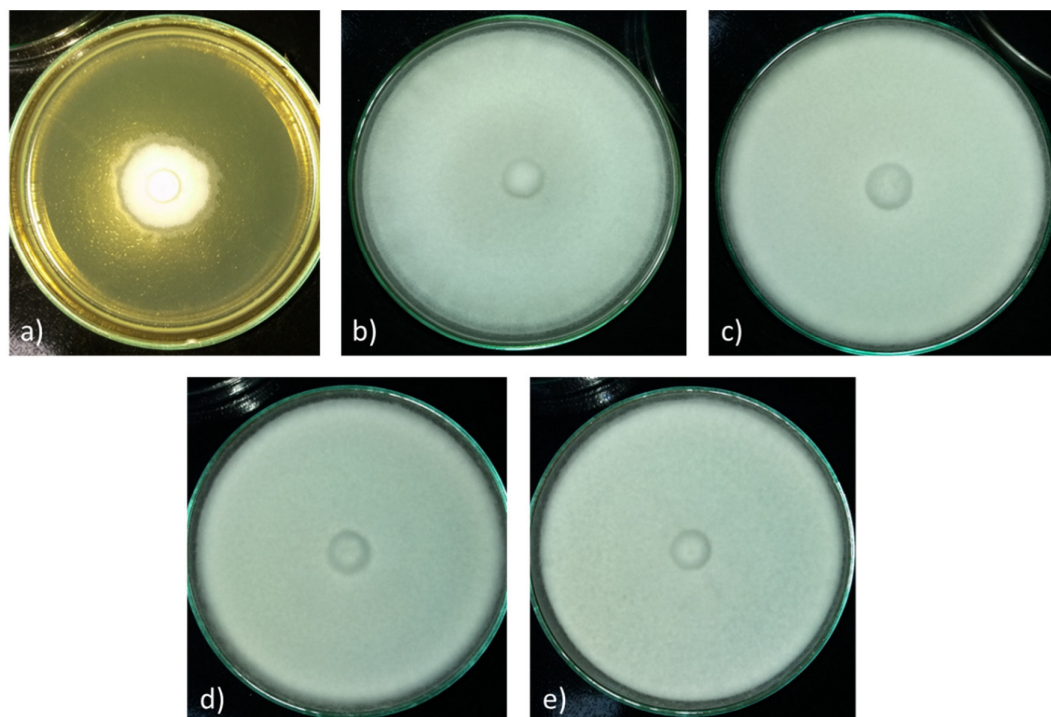


Figura 43. Morfología en placa de la cepa *Trichoderma koningiopsis* (MSCJ3) con 3 días de incubación en Agar YPG, a 25 °C a diferentes pH: a) pH 2.0, b) pH 3.0, c) pH 4.0, d) pH 5.0, e) pH 6.0.

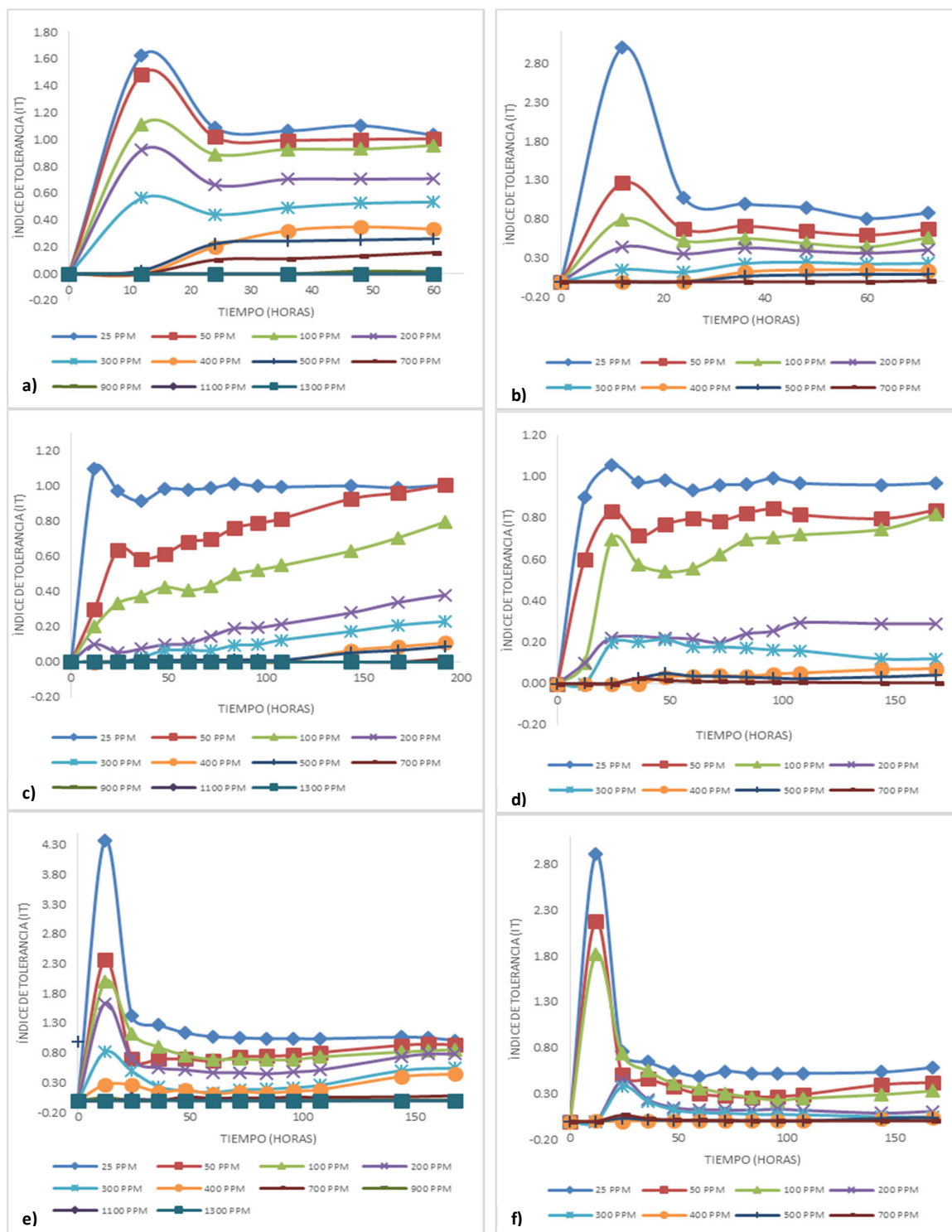


Figura 44. Índice de tolerancia (IT) a diferentes concentraciones de metales: Cr (25 a 1300 ppm) y Cd (25 a 700 ppm) **a)** IT de *Trichoderma asperellum* (MRYP4) frente a Cr VI, **b)** Tolerancia de *Trichoderma asperellum* (MRYP4) frente a Cd II, **c)** IT de *Trichoderma* sp (MRMP1) frente a Cr VI, **d)** IT de *Trichoderma* sp (MRMP1) frente a Cd II, **e)** IT de *Trichoderma koningiopsis* (MSCJ3) frente a Cr VI **f)** IT de *Trichoderma koningiopsis* (MSCJ3) frente a Cd II.

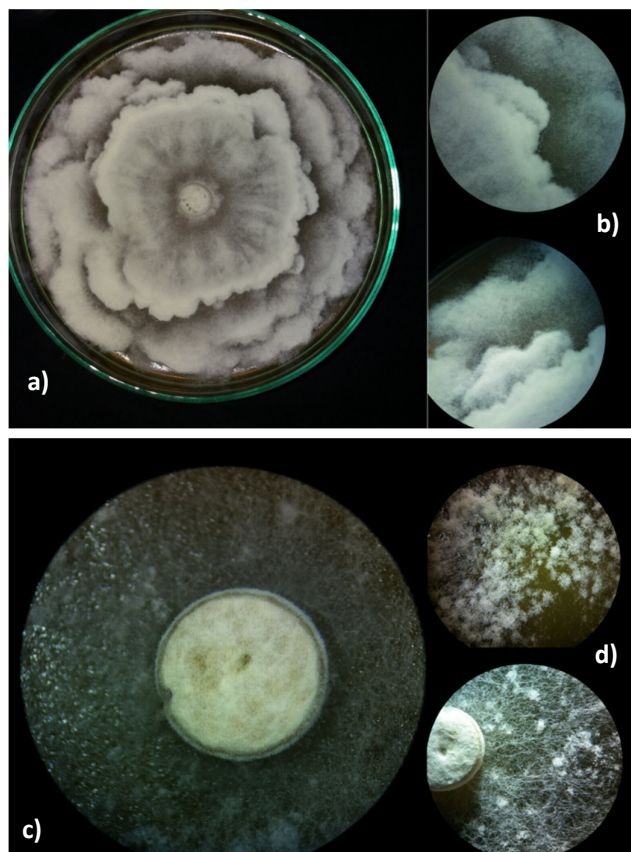


Figura 45. a) Morfología en placa de la cepa *Trichoderma asperellum* (MRYP4) a 50 ppm de Cd II con 39 días de incubación. b) Además se observa notorio crecimiento irregular, bordes irregulares (vista estereoscopio). c) Cepa *Trichoderma asperellum* (MRYP4) a 1100 ppm de Cr VI con 18 días de incubación en. d) Además se observa crecimiento irregular, formación de agrupaciones de micelios (vista estereoscopio).

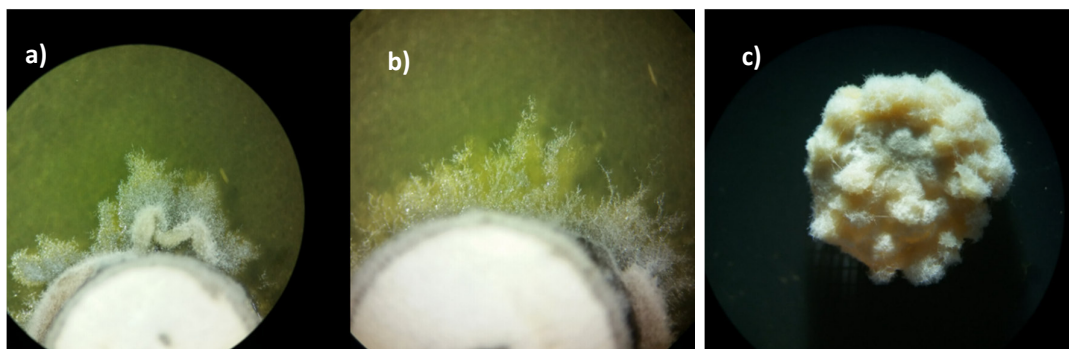


Figura 46. a) Morfología en placa de la cepa *Trichoderma sp* (MRMP1) a 500 ppm de Cd II con 18 días de incubación. b) también se observa notorio crecimiento irregular y ramificado de las hifas en el borde de la colonia (vista estereoscopio). c) Cepa *Trichoderma koningiopsis* (MSCJ3) a 700 ppm de Cd II con 18 días de incubación, se observa solo crecimiento sobre el trozo de agar (inóculo), nulo crecimiento en la superficie del agar (vista estereoscopio).

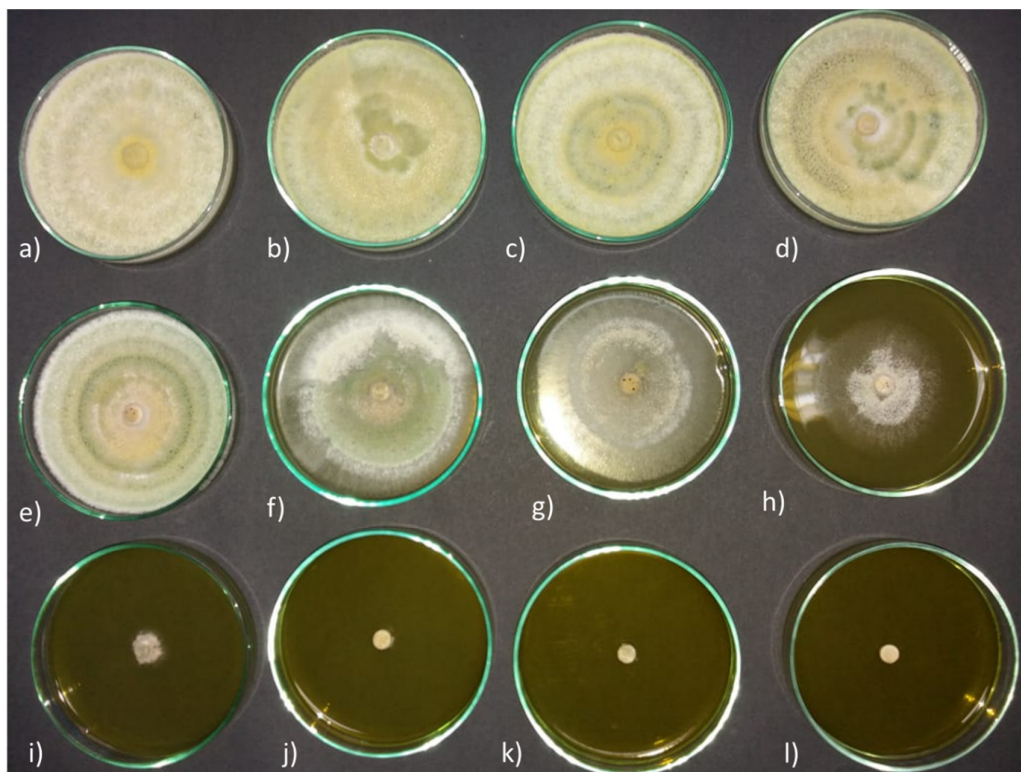


Figura 47. Morfología en placa de la prueba de tolerancia de la cepa *Trichoderma asperellum* (MRYP4) con 5 días de incubación en agar YPG suplementado a diferentes concentraciones de Cr VI. a) control, b) 25, c) 50, d) 100, e) 200, f) 300, g) 400, h) 500, i) 700 ppm, j) 900ppm, k) 1100 y l) 1300 ppm.

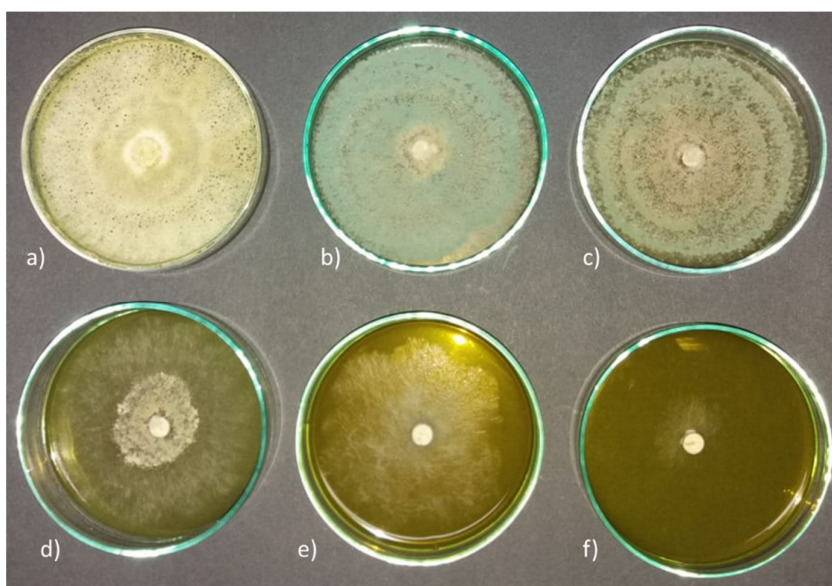


Figura 48. Morfología en placa de la prueba de tolerancia de la cepa *Trichoderma asperellum* (MRYP4) con 14 días de incubación en agar YPG suplementado a diferentes concentraciones de Cr VI. a) Control, b) 500, c) 700, d) 900, e) 1100 y f) 1300 ppm.

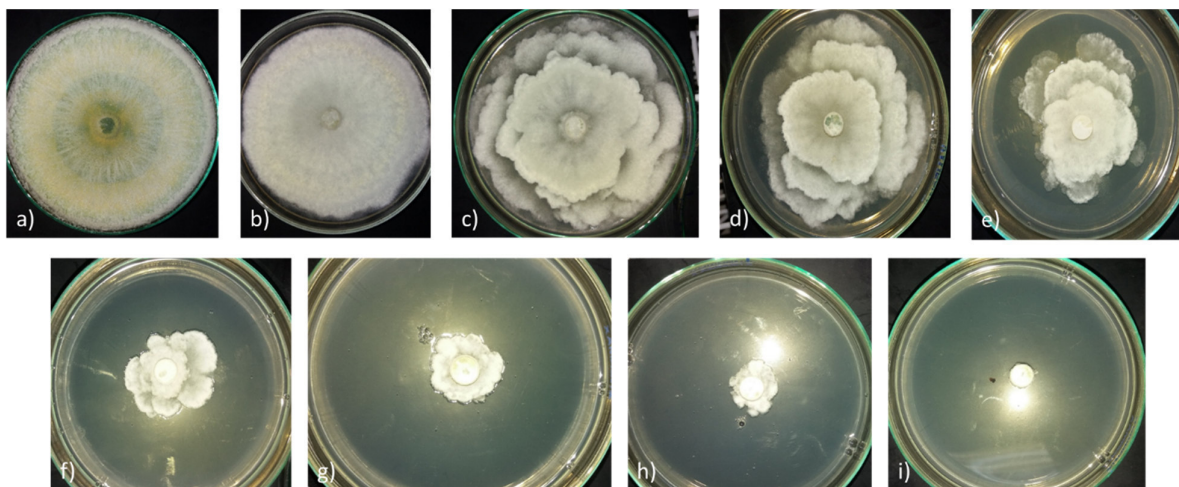


Figura 49. Morfología en placa de la prueba de tolerancia de la cepa *Trichoderma asperellum* (MRYP4) con 5 días de incubación en agar YPG suplementado a diferentes concentraciones de Cd II. a) control, b) 25, c) 50, d) 100, e) 200, f) 300, g) 400, h) 500 y i) 700 ppm.

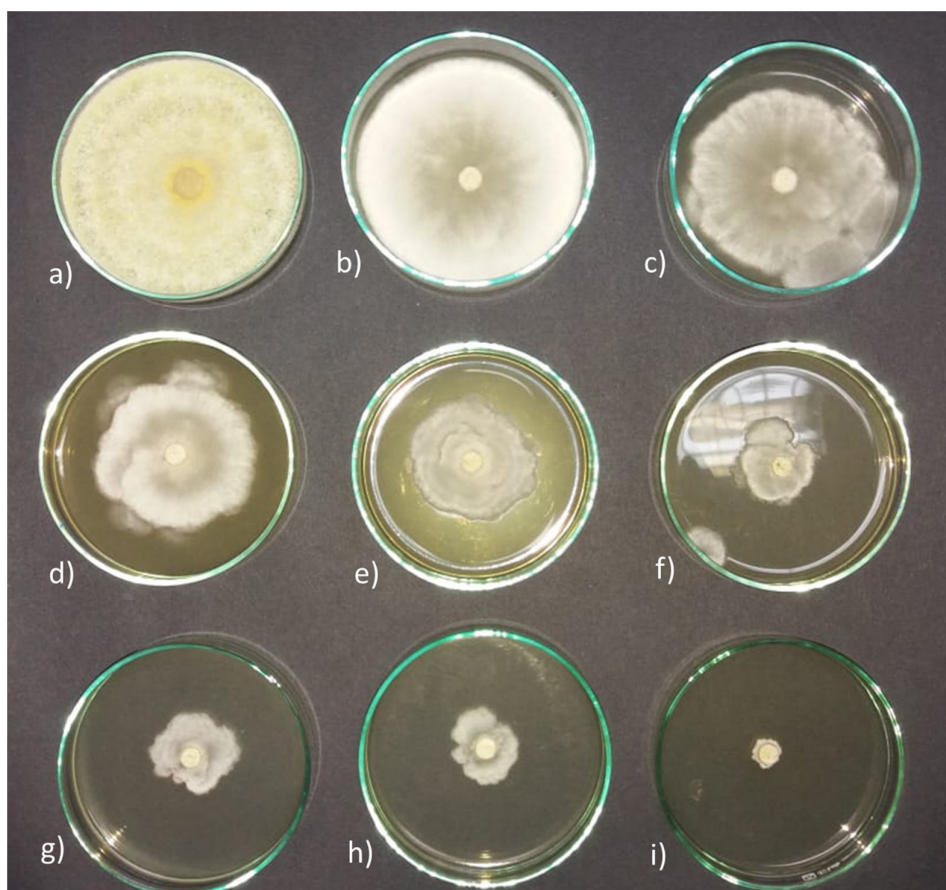


Figura 50. Morfología en placa de la prueba de tolerancia de la cepa *Trichoderma asperellum* (MRYP4) con 14 días de incubación en agar YPG suplementado a diferentes concentraciones de Cd II. a) control, b) 25, c) 50, d) 100, e) 200, f) 300, g) 400, h) 500 y i) 700 ppm.

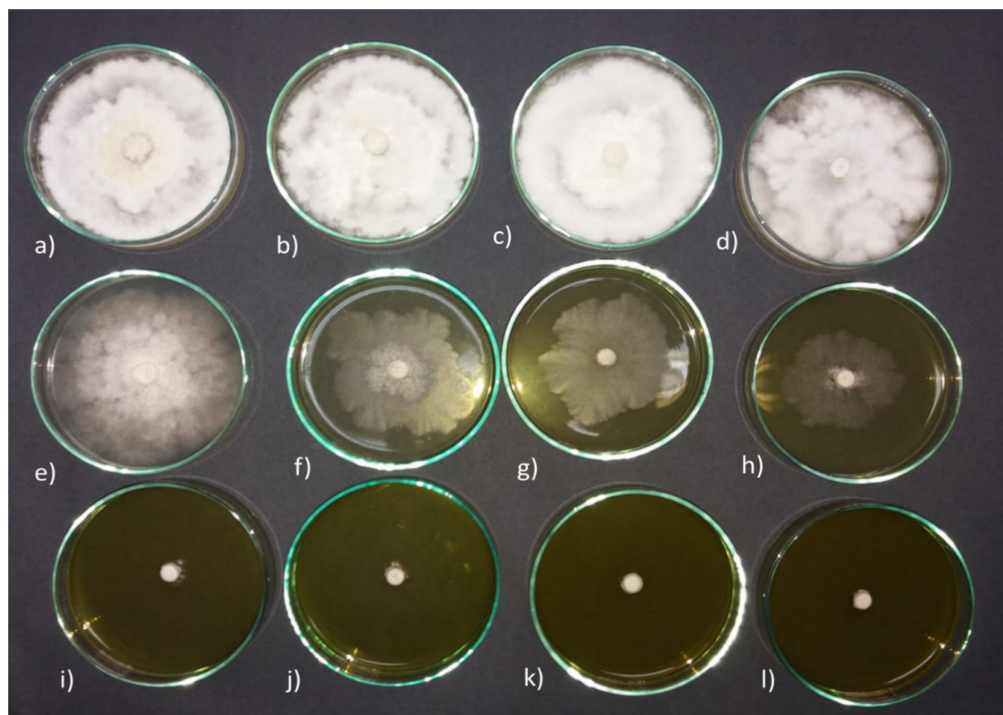


Figura 51. Prueba de tolerancia de la cepa *Trichoderma* sp (MRMP1) con 14 días de incubación en agar YPG suplementado a diferentes concentraciones de Cr VI. a) control, b) 25, c) 50, d) 100, e) 200, f) 300, g) 400, h) 500, i) 700 ppm, j) 900, k) 1100 y l) 1300 ppm.

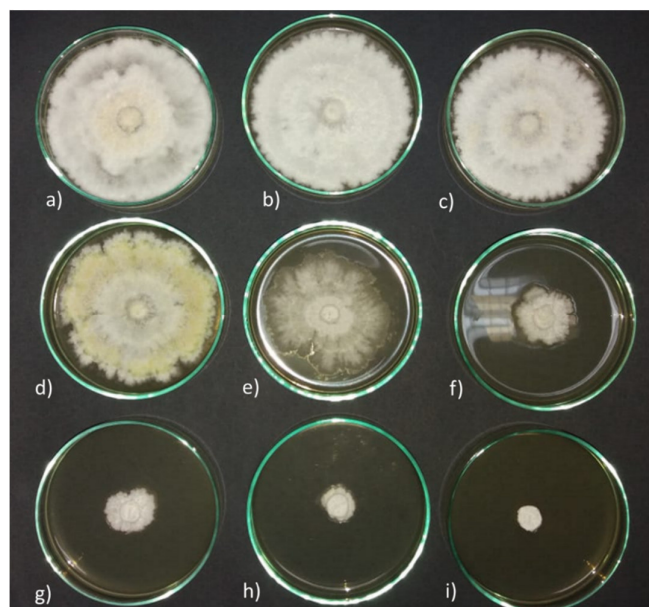


Figura 52. Morfología en placa de la tolerancia de la cepa *Trichoderma* sp (MRMP1) con 14 días de incubación en agar YPG suplementado a diferentes concentraciones de Cd II. a) control, b) 25, c) 50, d) 100, e) 200, f) 300, g) 400, h) 500 y i) 700 ppm.

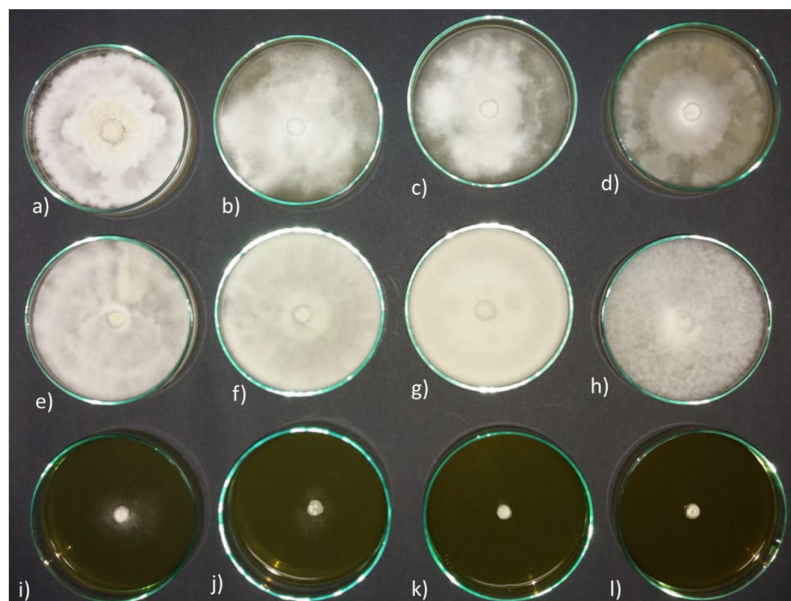


Figura 53. Morfología en placa de la prueba de tolerancia de la cepa *Trichoderma koningiopsis* (MSCJ3) con 14 días de incubación en agar YPG suplementado a diferentes concentraciones de Cr VI. a) control, b) 25, c) 50, d) 100, e) 200, f) 300, g) 400, h) 500, i) 700 ppm, j) 900, k) 1100 y l) 1300 ppm.

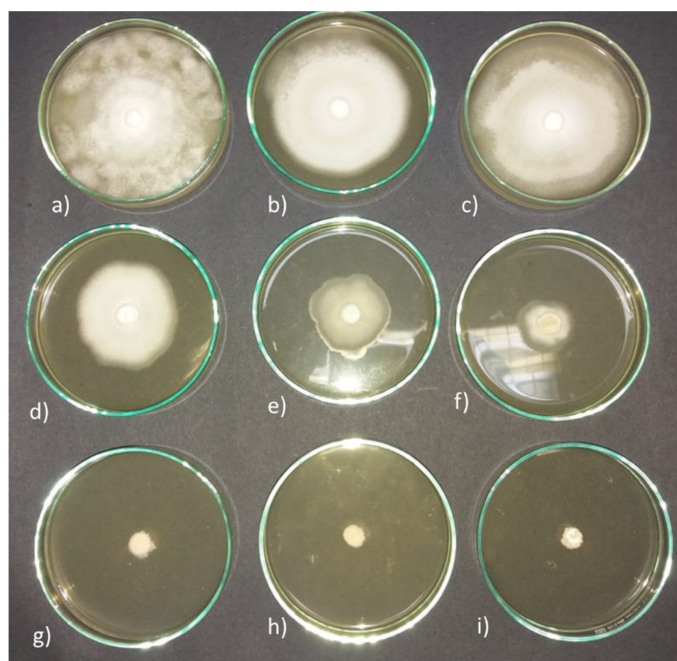


Figura 54. Morfología en placa de la prueba de tolerancia de la cepa *Trichoderma koningiopsis* (MSCJ3) con 14 días de incubación en agar YPG suplementado a diferentes concentraciones de Cd II. a) control, b) 25, c) 50, d) 100, e) 200, f) 300, g) 400, h) 500 y i) 700 ppm.